(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-500493

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)1月19日

(51) Int.Cl.*

難別記号 庁内整理番号

ZNA A 9453-4B

F I

C12Q 1/68

審査請求 未請求 予備審査請求 有

(全 20 頁)

特顏平5-503014 (21)出票番号 (86) (22) 出顧日

平成4年(1992)7月17日

(85)翻訳文提出日

平成6年(1994)1月19日 PCT/US92/06045

(86)国際出願番号

WO93/02116

(87)国際公開番号

(87)国際公開日 (31)優先権主張番号 平成5年(1993)2月4日

(32)優先日

732, 219 1991年7月19日

(33)優先権主張国

米国(US)

(81)指定国

EP(AT, BE, CH, DE,

DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N

L, SE), AU, CA, JP

(71)出願人 アプステイト・パイオテクノロジー・イン

コーポレーテツド

アメリカ合衆国ニユーヨーク州12946レイ

クプラシド・サラナクアペニユー89

(72)発明者 ワグナー、ロバート・イー、ジユニア

アメリカ合衆国ニユーヨーク州12989パー

モントビル・ポツクス236・ルート1

(72)発明者 ラドマン, ミロスラブ

フランス国75013パリ・アペニユーデイタ

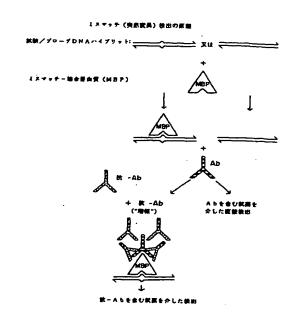
リ 139

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉

(54) 【発明の名称】 突然変異の検出法

(57)【要約】

1個の塩基の変化又は約1-4塩基対の付加あるいは 欠失などの突然変異の検出法は、MutSなどのDNA ミスマッチー結合蛋白質の利用に基づいており、その蛋 白質は1個の塩基ミスマッチ又は不対塩基を有する核酸 ハイブリッドに結合し、それによりヌクレオチド配列中 に1個の塩基変化のような小さい変化を含む突然変異の 検出を可能にする。そのような方法は多様な重要な疾患 状態又は罹り易さの診断、例えば突然変異発癌遺伝子の 存在の検出に有用である。本方法はPCRに基づく方法 の効率に関する利点を共有するが、行うのにもっと簡単 で安価である。本発明の方法の実行に有用なキットも提 示する。



蓄水の範囲

- 1. (a) 試料を、額的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に包値的な少なくとも1個の1本値塩基配列を含む1本値ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共に、該ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得る試報的ポリヌクレオチドの突然変異又は非突然変異配列にハイブリッド形成をしてハイブリッドを形成するのに適した条件下でインキュペートし、
- (b) 股階 (a) で形成されたハイブリッドをミスマッチー輸合量白 智と接触せる。
- (c) 狭ハイブリッドに結合したミスマッチー総合蛋白質の存在を検 出する設階を含み、それによりミスマッチー総合蛋白質の存在の検出が 試料のポリヌクレオチドの配列中の実然変異の存在の指領となることを 特徴とする、試料中の1本機構的ポリヌクレオチドの非実然変異配列か ら実然変異を検出する方法。
- 2. 鋏ボリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーがDNAであることを特徴とする、薬水の範囲1に配飲の方法。
- 3. 味ハイブリッド形成パートナーDNAがcDNAであることを特徴 とする、彼水の範囲2に記載の方法。
- 4. 鉄棚的ポリアクレオチドがDNAであることを特徴とする、簡求の 範囲 1 に記載の方法。
- 5. 談ミスマッチー結合蛋白質がMot S蛋白質又はその機能的誘導体であることを特徴とする、純水の範囲1に記載の方法。
- 6. 線試料がその中に存在する破骸を放出し、変性させるのに十分な条件に会わせた生物学的試料又は被であることを特置とする、額求の郵便

1に記憶の方法。

- 7. 放出された弦装款につき、弦変性の前に創業エンドスクレアーゼ切 断数物を行うことを特徴とする、請求の範囲6に記載の方法。
- 8、鉄ポリスクレオチドハイブリッド形成パートナーを表帯 (a) の鉄インキュベートの前に関体組体上に確定することを特徴とする、請求の報酬1に記載の方法。
- 9. 鉄部体包体がニトロセルロース膜であることを特徴とする、精水の 戦器8に記載の方法。
- 10. 該後出設帝が後出可能な審議をされ、該ミスマッチー第合要白質 に総合することができる第1総合パートナーの提加を含むことを特徴と する、請求の範囲1に記載の方法。
- 11. 映第1組合パートナーが放ミスマッチー組合蛋白質に特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲10に記載の方法。
- 12. 鉄俵出股降が、旅ミスマッチ・総合製白質に総合でき、検出可能 な標識をされていない第1結合パートナー、及び鉄第1結会パートナー に給合することができる第2結合パートナーの集加、及び鉄第2軸合パ ートナーの存在の検出を含むことを特徴とする、額次の範囲1に記載の 方法。
- 13. 装第2輪合パートナーが装飾1結合パートナーに传真的な放体であることを特徴とする、観水の範囲12に記載の方法。
- 14. 政第2結合パートナーがMutL要白質又はその機能的調果体であることを特徴とする、請求の範囲12に記載の方法。
- 15. 鉄第2雑合パートナーがMutL及び映出可能な第2蛋白質あるいはペプチドの融合量白質であることを特徴とする、譲収の範囲14に

記載の方法。

- 16. 該第2番白質がペーターガラクトンダーゼであることを特徴とする、額水の範囲15に記載の方法。
- 17. 駅槽(b)の狭ミスマッチー結合蛋白質が検出可能な第2蛋白質 又はペプチドと融合した融合蛋白質であることを特徴とする、第次の臨 期1に記載の方法。
- 18. 旅館出政階が試第2要白質又はペプチドに結合することができる 第2結合パートナーの添加及び該第2結合パートナーの存在の彼出を含 むことを特徴とする、緯水の範囲17に記載の方法。
- 19. 紋第2百百質がベーターガラクトンダーゼであることを特徴とする。 油水の範囲18に配数の方法。
- 20. 該第2番白質が色素原酵素蓄質からの着色反応生成物の形成を触 係することができる酵素であり、減検出設階が減色素原基質を与えて該 着色反応生成物を視覚化することを含むことを特散とする、請求の範囲 17に記載の方法。
- 21. (a) 試料を、物のボリヌクレオチドの赤突然変異配列に相続的な少なくとも1種の1本領権基配列を含む1本領ボリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共に、該ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得る該哺乳類様的ボリヌクレオチドの突然変異又は非突然変異配列にハイブリッド形成をしてハイブリッドを形成するのに適した条件下でインキュペートし、
- (b) 駅前 (a) で形成されたハイブリッドをミスマッチー箱合置白 質と検給せさ、
 - (c) 抜ハイブリッドに結合したミスマッチー総合裏白質の結合を検

出する段階を含み、それによりミスマッチー独合蛋白質の結合の検出が 試料の哺乳類ポリヌクレオチドの配列中の突然変異の存在の指揮となる ことを特徴とする、試料中の1本機能的哺乳類ポリヌクレオチドの非疾 然変異配列から突然変異を検出する方法。

- 22、その中に1個又はそれより多い容器を与えられるように適合させ 。 ...
- (a) 僚的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に相補的な少なくとも 1 個の 1 本領塩基配列を含む 1 本領ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを含む第1 容器:
 - (b) ミスマッチー箱合蛋白質を含む第2容器;及び
- (c) ミスマッチー結合蛋白質のはハイブリッドへの結合を検出する ことができる試験又は試験群を含む第3容器あるいは複数の容器を含む、 試料中の標的ポリヌクレオチド配列の非突然変異配列から突然変異配列 を検出するのに有用なキット。
- 23. 膜ミスマッチー箱合置白置がMu I S又はその機能的誘導体であることを特徴とする、旗攻の範囲2.2に記載のキット。
- 24. 蘇試高又は試高群がミスマッチ・結合銀白質と結合することがで きる少なくとも1個の第1結合パートナーを含むことを特徴とする、猿 球の範囲22に記載のキット。
- 25. 鉄第1結合パートナーがミスマッチー結合蛋白質に特異的な抗体であることを特徴とする、摘求の短囲24に記載のキット。
- 28. 球状器又は状態群が、該ミスマッチー総合蛋白質に能合でき、後 出可能な振識をされていない第1結合パートナー、及び該第1結合パー トナーに結合できる第2結合パートナーを含むことを特徴とする、請求

の範囲19に記載のキット。

- 27. 放第2輪合パートナーが放第1輪合パートナーに特異的な抗体であることを特徴とする、請求の範囲26に記載のキット。
- 28. 装第1箱台パートナーがMut上裏白質又はその機能的病毒体であることを特徴とする、請求の機器26に記載のキット。
- 29、該第1結合パートナーがMutL及び検出可能な第2重白質又は ペプチドの間の融合蛋白質であることを特徴とする、請求の範囲28に 記載のキット。
- 3 O. 競節2回白質がベーターガラクトシダーゼであることを特徴とする、禁水の範囲29に記載のキット。
- 31. 放第2結合パートナーが該MutL型白質又は機能的誘導体に結合できることを特徴とする、論求の範囲29に記載のキット。
- 32、核ハイブリッド形成パートナーを間体担体上に創定することを特 数とする、鎖球の範囲22に記載のキット。
- 33. 球団体担体がニトロセルロース膜であることを特徴とする、額求の範囲31に記載のキット。
- 34. 該ミスマッチー結合蛋白質が酵素と融合した融合蛋白質であり、 鉄試器が抜酵素のための色素原基質を含むことを特徴とする、値次の範 圏19に記載のキット。

(Albarella <u>et al</u>. 、欧州特許第144914号明祖書)、化学課職 (Sheldon ill et al. 米国特許第4.582.789号明細書:Albarella <u>et al</u>. 米国特許第4.563.417号明細書)、佐帥塩基 (Miyash! <u>et al</u>. 、欧州特許第119448号明細書) などの多様な課題がこの目的で用いられてきた。

いくつかの核酸検出系が特定の突然変異の検出のために設計され、そ れはプローブと追加の結合パートナーの組み合わせを含み、後者はレポ ーターとして動く。Pasu <u>et</u> <u>al</u>. , 米国特許第4、556、 6.4.3 号明確書は、標的一特異的配列及び蛋白質一結合配列を有するボ リヌクレオチドプローブを開示している。ほとんどの場合ものような姿 白質-結合配列は、你的~特異的セグメントに連結されたDNAの外部 セグメント(ヒスして8.5cgment)である。用いられる給合金 白質は、蛋白質=除素性合体などの蛋白質=マーカー性合体の一様であ ることができる(何7、行7-10)。 期示されている結合蛋白質はD NA一條的酵素、ポリメラーゼ、ラクトースリプレッサー又は抗原性D NA配列である(何7、行10-29)。この参照文献に記載されてい るプローブの典型的例(実施例 I、第12及び13)は、cDNA分子 (銀的DNA配列とハイブリッド形成できる)であり、それにT?プロ モーター(蛋白質核合配列)が連結されている。このプローブのハイブ リッド形成の後にE、コリ(E, coli)RNAポリメラーゼが結合 蛋白質として加えられ、T7プロモーターに結合する。 結合したRNA ポリメラーゼの存在は、ポリメラーゼに特異的なウサギ抗毒剤、及びモ の後パーオキシダーゼー複合化ヒツジー抗ウサギ第2抗体、ならびにパ

実然変異の輸出性

背景の説明

数料中の特定の技験分子の存在を検出できる検定技法、実気の予想及び診断、技医学、哲学及び公務衛生において真實的に重要である。そのような検定技は例えば患者における突然変異遺伝子の存在の検出に用いることができ、患者が遺伝質に罹る可能性を決定することができる。細胞の発症遺伝子における個別の突然変異がその発感遺伝子を活性化し、その細胞を繊細胞に収換し得るという発見と共に、癌の早期発見又は癒に罹り易さの発見における突然変異の検出能力の重要性が増してきた(Nishimura.S. et al., Biochem.J: 24 3:313-327 (1987):Bos, J. L., Cancer Res. 49:4682-4689 (1989))。

核酸検出検定接は、核酸分子の多くの特性、例えばその寸法、配列、 制限エンドヌクレアーゼにより揺化される傾向などのいずれに基づくこ ともできる。そのような検定性の感度は、検出が報告されるか又は観察 者に信号が送られる方法を変えることにより向上させることができる。 挺って例えば検出可能な無線をした試薬を用いることにより検定感度を 向上させることができる。酵素機織(Kourilsky ct al... 米国特許第4.581.333号明練者)、放射性同位体機嫌(Fal... kow ct al...米国特許第4.358.535号明細書:Berninger.米国特許第4.466.236号明細書)、並光機識

ーオキンダーゼー抗ーパーオキシダーゼ検出系により検出される。

Mundy、米国特許第4、658、127号明都書は、特定のタクレオチド塩基の突然変異を検出する方法を開示しており、それは問題の領域の配列がわかっていることが必要であり(第1、行52-43)、実践変異が制限部位になくても良いという利点を有する。実然変異の部位から1方向に延びる核酸鏡の一部に相信的な痕鏡状プローブが慢示されている。ハイブリッド形成の後に、特定の塩基配列が存在するか不在かに依存してプローブの末端に結合するヌクレオチド講尊体が加えられる。1本鏡部分は消化される。その後プローブの存在又は不在が検出される(第2、行3-22)。参照文献ではヌクレオチド講尊体としてチオヌクレオチドが考えられており(簡4、行46-51)、それは検出可能な嫉職をすることにより検出される。

Kato <u>et</u> <u>a1</u> , 取州特許公開第407.789号明編書は、 機職プロープを用いたハイブリッド形成に基づく核酸の検出途を開示し ている。非放射性機能の中に、ビオチンーアビジン系を用いた酵素及び 蛍光が挙げられている(質2、行36-39)。機能の例はビオチンー 機能dUTPであり、合成によりプロープ中に挿入される。

検験ハイブリッドにおけるミスマッチ協議対の検出のために設計された多くの方法が当該技術分野において展知である。初期の方法はミスマッチの解素切断に基づいていた(Gibbs.R. et al. Science 236:303-305(1987))。これらの方法はミスマッチDNAハイブリッドを酵素により切断する段階を含む。これらの方法の欠点の1つは、すべてのミスマッチを確実には検出しないことである。最近記載されたミスマッチDNAの切断のための化学的方法

特表平7-500493 (4)

(Cotton. R. G. et al. Proc. Netl, Sci. USA 85:4397-4401 (1988): Cotton. R. G. Nuc. Acids Res. 17:4223-4233 (1989)) は多くの試賞、特に四酸化オスミウム及びヒドロキシルアミンを用いたDNA-DNAへテロ2本値におけるミスマッチ部位の化学的切断に基づく。この方法の場合、DNAプローブは復居のDNAの制限酵素切断により調製される。問題の配列を含むプラスミドDNAを顕微プローブDNA (****Pを用いた末端ー都識又は内部観測)にハイブリッド形成させる。ヒドロキシルアミンセミスマッチしたシトシンを化学的に修飾し、四酸化オスミウムはミスマッチしたチミンを修飾する。その後ピペリジンを用いて修飾部位でDNAを切断し、使いてポリアクリルアミドゲル電気体動(PAGE)及びオートラジオグラフィーを行い、切断生成物を同定する。この方法は、ミスマッチに開映する正常の塩釜対での切断も生ずるので、すべての可能な1億のミスマッチ塩基膜対を被出するという利点を有すると書われている。

Caskey及び共同研究者等は実然変異の位置決定の方法を開示しており、それはミスマッチ切断反応のための時型無としてPCRー増幅cDNAを用いる。この方法はオルニチントランスカルバモイラーゼ (OTCase) 欠乏症患者の研究で実然変異のマッピングに適用された。

Kung <u>et s.1</u>., 米国特許第4.963.658号明細書は、高額和性s * DNA - 結合蛋白質、例えばトポインメラーゼ又はそれ自身が振識に捨合できるDNA を戻し要白質(第2、行44-47)、例えば8-D-ガラクトシダーゼ(関7、行1)との結合による、1本額

単DNAに同一の処理が行われるように内部制御することができる。最後に方法は、例えば譲フィルター上の着色"プラス"又は"マイナス"の印などの、簡単で解釈の容易な結果を与えるように設計することができる。

本発明は2つの質要要素に基づいている。第1は誤対合又は非対合地 基を含む核酸ヘテロ2本額に結合する蛋白質の存在である。そのような ミスマッチー館合質白質の周知の例はパクテリア蛋白質、例えばDNA 修復において機能するE、コリのMutS蛋白質である。第2の要素は 特定の遺伝子及びその突然変異対立遺伝子の単離及び配列決定が比較的 容易であることである。

かくして本発明は、試料中の1本値ポリヌクレオチド(又は簡的ポリ ヌクレオチド)の配列中に突然変異が存在するかどうかを決定する方法 を目的とする。すなわちそれは突然変異価的ポリヌクレオチドの後出、 あるいはポリヌクレオチド(DNA又はRNA)中に突然変異が存在 (又は不在)するかどうかの決定の方法である。

方法において、突然変異額的ポリヌクレオチドに関して分析される試料は、非突然変異額的ポリヌクレオチドの配列と相補的な少なくとも1個の1本検塩器配列である1本検ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーと共にインキュペートされる。ハイブリッド形成パートナー及び、突然変異額的ポリヌクレオチドに関して評価されるポリヌクレオチド(例えばDNA又はRNA試料)は、ハイブリッド形成パートナーが試料中に存在し得るいずれの突然変異又は非突然変異類的ポリヌクレオチドともハイブリッド形成するために達した条件下でインキュペートされる。相傾的配列がハイブリッド形成オート

DNA (s a DNA) の検出につき観示している。

現在利用できる検定性の用途及び適用性を増す個かは多くの場合、場 値ならびに複雑性及び経費により失敗してきた。使ってより施度が高く、 簡単で、比較的安価な、DNAにおける改変の検出のための検定性の関 発が非常に質まれている。

発売の保護

本発明は配列中に1塩基の変化のような小さい変化を含む核酸配列の 実施変異を検出する方法に関する。試料中に報的ポリヌクレオテドが存 在する程度も快定することができる。本方法は2. コリ及びサルモネラ (Salmonella)のMutS型白質を例とするミスマッチー線 金蛋白質の利用に基づいている。本明細書で用いられる領的ポリヌクレ オチドという用語は検出されるべき核酸配列である。突然変異を含まない概的ポリヌクレオチド配列(条改変形態)は、非実然変異複的ポリヌクレオチド配列は、実然変異類的ポリヌクレオチドと言われる。実然変異でな変を含む物的ポリヌクレオチド配列は、実態変異類的ポリヌクレオチドと言われる。本方法は、例えば完然変異免患遺伝子の存在を検出することにより、多様な重要疾患状態又は個り易さを診断するのにに有用である。方 法はPCRに基づく方法の効率に関する利点を共有するが、実施することがもっと簡単で安価である。発明者等は本発明の方法を行うためのキットの実施も行った。

分析するDNAは血液部的、物子又は生物、好ましくはヒトの組織から降たDNAなどのいずれの種類であることもできる。本発明の方法は PCRで用いられるような物巧な、又は高低な装置を必要とせず、洗練された訓練なしで技術者が行うことができる。方法は、試験試料及び編

ナーと標的ポリヌクレオチドのハイブリッドが形成される。形成された
ハイブリッドを、ミスマッチー給合蛋白質が突然変異領的ポリヌクレオ
チドに結合するのに進した条件下で、ミスマッチー結合蛋白質と合わせ
る、又は接触させる。これによりミスマッチー結合蛋白質が、何的ポリ
ヌクレオチドが突然変異様的ポリヌクレオチドであるハイブリッドに結合することになる。ハイブリッドに結合したミスマッチー結合蛋白質の
存在の検出は、試料中のポリヌクレオチドの配列中に突然変異が存在することを示す(すなわち突然変異様的ポリヌクレオチドの存在を示す)。

上記において、ハイブリッド形成パートナーはDNA、例えばcDN A又は合成オリゴヌクレオチドであることが好ましい。 傑的ポリヌクレ オチドはDNA又はRNAであることができる。 好ましいRNAはmR NAである。

上記の方法で、好ましいミスマッチー結合蛋白質はMutS蛋白質あるいはその機能的誘導体である。

方法の意味の1つにおいては料は、存在するいずれの味酸も飲出し、 変性する(1本娘とする)のに十分な状態に会わせた生物学的液体であ る。場合により放出された核酸につき、変性の前に創限エンドメクレア ーゼ切断の段階を行う。

ある態様の場合、ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを固体但体上に固定し、得られた固体组体一結合ハイブリッド形成パートナーを突然変異等的ポリヌクレオチドの存在に関して舒循されるべきポリヌクレオチドの試料と共にインキュペートする。好ましい固体但体はニトロセルロース版である。

検出段階は、ミスマッチー結合蛋白質と結合する検出可能な機能をし

特表平7-500493 (5)

た第1組合パートナーを加えることを含むのが好ましい。第1組合パー トナーは例えばミスマッチー独会兼白質に特異的な抗体、又は輸出され る着色反応生成物の形成を触媒する酵素であることができる。

他の思様の場合、技出設階はミスマッチー結合蛋白質と結合し、技出 可能な保険をされていない第1独合パートナー、及び第1組合パートナ ーと結合する第2結合パートナーを加え、第2結合パートナーの存在を 検出することを含む。第2倍合パートナーはそれ自身検出可能な保護を されていることができ、又は第2結合パートナーに結合する検出可能な 横端をされた第3站合パートナーを用いることもできる。好ましい第2 結合パートナーは第1結合パートナーに関する抗体である。他の結構の 場合、第2歳合パートナーはMullを内置又はその無償的業業体。任 ましくはMut しと検出の可能な第2畳白質又はペプチドの間の融合値 白質である。融合蛋白質における好ましい第2蛋白質はベーターガラク トシダーゼである。

他の節様の場合、ミスマッチー結合蛋白質は融合蛋白質の1成分であ り、その第2成分は直接(すなわちそれ自身が検出可能)又は間接的に (すなわち検出可能な試薬を用いて) 検出することができる第2張白質 又はペプチドである。この態様の場合、検出政策は融合額白質中に存在 する第2張白質又はペプチドと結合する、検出可能な構築をした結合パ ートナーを加えることを含むのが好ましい。第2蛋白質は色素顕酵素基 質からの着色反応生成物の形成を触媒することができる酵素であること ができる。検出段階は、色素原基質を与えて着色反応生成物を視覚化す ることを含む。好ましい第2蛋白質はペーターガラクトシダーゼである。 本発明はさらに、試料中の1本鏡標的哺乳類ポリヌクレオチドの非英

- (c)ミスマッチー結合蛋白質のハイブリッドへの結合を検出するこ とができる試験又は試験群を含む第3容器あるいは複数の容器。

(b) ミスマッチー約合蛋白質を含む第2容器:及び

上記のキットにおいて、ミスマッチー結合蛋白質はMuliS又はその 機能的誘導体が好ましい。試養又は試薬群は、ミスマッチー結合蛋白質 に結合することができる検出可能な振識をされた第1結合パートナーを 少なくとも1個合むのが好ましい。好ましい第1給合パートナーはミス マッチー結合蛋白質に特異的な抗体である。

キットの別の無様の場合、試震又は試蔵群は検出可能な細胞をされて いない第1結合パートナーを含み、第1結合パートナーはミスマッチー 箱合蛋白質と結合することができ、抗体などの第2結合パートナーが第 **1箱合パートナーに結合することができる。第2箱合パートナーは検出** 可能な模様をされていることができる。第2結合パートナーが保護され でおらず、第2結合パートナーに結合することができ、後出可能な保護 をされた第3時合パートナーを含むキットも意図されている。

好ましいキットの態様の場合、第1結合パートナーはMutL製白質 又はその機能的誘導体、例えばMu t L と検出できる第2蛋白質又はペ プチド、紆ましくは β ーガラクトシダーゼの間の融合蛋白質である。第 2結合パートナーはMu t L蛋白質又はその融合パートナー蛋白質に結 合することができ、例えば β ーガラクトシグーゼに特異的な抗体である。 上記のキットにおいて、ハイブリッド形成パートナーは個体担体上に 節定されているのが好ましい。好ましい節体担体はニトロセルロース線

キットの他の態情において、ミスマッチー館合蛋白質は酵素と融合し

然変異配列から突然変異配列を装出(区割)する方法を目的とする。こ の方法では最知の方法を用いて哺乳類ポリメクレオチドの試料(DNA 又はRNA)を得る。例えばDNA又はRNAを細胞から得、それを処 選して1 本策とし、非交然変異都的哺乳腺ポリヌクレオチドの配列と相 株的である少なくとも1つの1本銀塩基配列である1本輪ボリヌクレオ チドハイブリッド形成パートナーと共にインキュペートすることができ る。DNA又はRNA及びハイブリッド形成パートナーを、ハイブリッ ド形成パートナーが試料中に存在し得るいずれの突然変異又は非突然変 異無的ポリヌクレオチドともハイブリッド形成するために遠した条件下 でインキュペートする。相構的配列がハイブリッド形成すると、ハイブ リッド形成パートナーと側的ポリヌクレオチドのハイブリッドが形成さ れる。形成されたハイブリッドを、銀的ポリメクレオチドが突然変異様 的ポリヌクレオチドであるハイブリッドとミスマッチー結合蛋白質が縮 合するのに適した条件下で、ミスマッテー轄合銀白質と合わせる、又は 接触させる。ハイブリッドに結合したミスマッチー結合蛋白質の存在の 後出は、試料の哺乳類ポリヌクレオチドの配列中に突然変異が存在する ことを示す(すなわち突然変異様的ポリヌクレオチドの存在を示す)。 本発明は試料中の突然変異様的ポリヌクレオチドの検出(非突然変異

集的ポリヌクレオチド配列からの突然変異線的ポリヌクレオチドの区別) に有用なキットを含む。キットは以下を含む:

(a) 你的ポリヌクレオチドの非突然変異配列に招情的(すなわち非 突然変異様的ポリヌクレオチドに相補的) な少なくとも1個の1本領塩 基配列を含む【本債ポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを含 む第19四:

た融合蛋白質であり、飲煮は酵素に飼する色素原基質を含む。 図面の簡単な説明

図1はオリゴヌクレオチドの形態のハイブリッド形成パートナー又は cDNAハイブリッド形成パートナーの、試験又は"棚的"DNAとの ハイブリッド形成を示す略図である。図の下部はミスマッチ含有ハイブ リッドの形状を示す。cDNAがゲノムDNAフラグメントとハイブリッ ド形成した場合、ゲノムDNAの非ハイブリッド形成部分(イントロン) は環状に実ま出ることが示されている。

図2は本発明の突然変異検出検定の略図である。この特定の譲継の場 合、ミスマッチー給合量白質の存在は、ミスマッチー給合置白質に特異 的な抗体である第1結合パートナーを用いて検出される。 この抗体は検 出可能な標識をされることができ、又は快出可能な保護をされた試薬に より検出されることができる(右下)。代わりに検出段階は第2箱合パ ~トナー、この場合第1抗体に特異的な抗体("抗ーAb(Anti~ Ab)゜)を用いて増幅することができる(左下)。

図3は実施例に記載されている特定の検定型式の略図であり、この場 合正及び負の標準がニトロセルロースフィルター上に置かれており、ミ スマッチが存在しない場合に目に見える"マイナス"の印が得られ、様 的DNAが突然変異(ミスマッチ)を含む場合に目に見える"プラス" の印が得られる。

図4は溶液中でアニールされたヘテロ2本糖におけるミスマッチ輸出 の結果を示す。

図5は固定オリゴヌクレオチドにアニールされたヘテロ2本酸におけ るミスマッチ検出の結果を示す。

個6は競争オリゴヌクレオチドの存在下でアニールをれたペチロ2本 銀におけるミスマッチ依出の結果を示す。

好ましい意味の説明

本発明者等は、1個の複雑の変化のような小さい改変でさえDNA配 列中の改変を検出するための、広く連用でき、比較的簡単な新様方法を 計画した。パクテリアDNAのミスマッチ装在装置は、注基分のミスマッ チを含む2本級DNAを認識してそれと総合する1個の裏白質又は蛋白 質の罪を利用している (詳しくは、Radman, M. <u>et al</u>. , Annu. Rev. Cenet. 20:523-538 (1986) ; Radman, M. et al., Sci. Amer., August 1988, pp. 40-46; Modrich, P. . J. Biol. Chem. 264:6597-6600(1988) 4年限)。Mut S重白質はE、コリのミスマッチ修復系におけるそのような成分として 間定された (Lahue, R. S. et al., Science 2 45:160-164(1989): Jiricny, J. et al. . Nucl. Acids Res. 16:7843-7853(1988): Su. S. S. et al. . J. Biol. Chem. 263:68 29-6835 91988) : Lahue, R. S. et al. . Mutat. Res. 198:37-43 (1988) ; Lahue. R. S. et ai. , Proc. Natl. Acad. Sci. US A 84:1482-1486 (1987) ; Dohet, C. et al., Mol. Gen. Cenet. 206:181-184 (19 87) : Jones, M. et al., Genetics 115: 605-610 (1987) : Su. S. S. et al. . Proc.

たミスマッチー総合最白質の存在を、その後多くの方法のいずれか1つを用いて、例えばミスマッチー総合蛋白質に特異的であり、検出可能な 観識をした抗体、例えば抗一MutS抗体を用いることにより検出する。この方法は、ミスマッチ塩基対にて、又はその近辺でDNAを破壊することができるミスマッチ切断ヌクレアーゼ酵素を用いる先行技術の方法と対照的に、そのまま保つ。この方法の飯略に関して、図2を参照せよ。本発明の方法により、試料中の特定の"椰的" 核散分子又はポリヌクレオチドの存在を検出することができる。そのような試料は典型的に生物試料、例えば由放、検子、便、血液、尿、・糖液、、地地など、ならびに乗生物試料、例えば排水又は飲料水、牛乳あるいは他の食物、空気などである。

本覧明の方法により検出される機的ポリスクレオチド又は核散分子はDNA又はRNAであることができるが、DNAが好ましい。ハイブリッド形成パートナーが c DNAの場合、傾的核酸はDNA又はmRNAであることができ、mRNAがより高いコピー数で存在する。本明細管で用いられる "親的核酸"、"傷のポリヌクレオチド"又は"傷的配列"という用語は、検出及び/又は定量されるべき問題の配列を含む核酸を含う。それは野生型配列を含むこともでき、その場合それは野生型又は赤突然変異領的ポリスクレオチドあるいは非突然変異領的配列と言われる。別の場合それは改変又は突然変異(野生型から突然変異した)を含むことができ、その場合それは突然変異領的ポリヌクレオチドと言われる。親的核酸における喉的配列は、ポリヌクレオチド内に改変又は突然変異が存在してもプロープDNA(ハイブリッド形成パートナー)とハイブリッド形成するのに十分な長さでなくてはならない。像の配列は、

特表平7-500493 (6)

Natl. Acad. Sci. USA 83:5057-5061 (1 986) : Dohet. C. et al. . Proc. Natl. Ac ad. Sci. USA 82:503-505 (1885) : Choy. H. E. et al. . Mutat, Res. 142:93-97 (1 985) : Jones, M. et al. . Mol. Gen. Gene 1. 184:562-563 (1981))。サルモネラ チフィムリ 74 (Salmone) la typhimurium) oMutS (Lu. A. L. et al. . Genetics 118:593-600 (1988) : Haber, L. T. et al. . J. Bac teriol: 170:197-202 (1988) : Pang. P. P. et al. . J. Bacteriol. 163:1007-10 15 (1985)) 及びストレプトコックス ニューモニアエ (<u>Str</u> <u>sptococcus</u> <u>pneumonise</u>)のhexA蛋白質 (Priebe, S. D. et al., J. Bacteriol. 170:190-196 (1988) : Haber et al. . 同 上)を含む無似の蛋白質が粒のパクテリア模で既知である。

特製MutS無白質はミスマッチ塩蓄を含むDNAと結合するが、ミンスマッチを含まないDNA、又は1本額DNAに結合しない。MutSーDNA相互作用はDNAの分解文は改変を生じない。

本方法は、実施変異 DNAの輸と野生型 DNAの "相値的" 観がハイブリッド形成した場合に形成されるミスマッチ DNA ヘテロ 2 本籍の検 出に基づいている(関1を参照)。ミスマッチの存在は、最初にMu t S要白質 E. コリなどのミスマッチ・結合蛋白質を DNA 2 本籍と結合 きせることにより、特異性の高い方法で検出することができる。結合し

本方法により検出されるために30推議より大きいことが好ましい。 静 様の1つの場合、ミスマッチー始合張白質の結合及びそれに続く検出が できるために、額的配列に関する必要なミスマッチを含む配列を有する "ハイブリッド形成パートナー" ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオ チドの構築を可能にするために、額的ヌクレオチド配列が既知でなけれ ばならない。

他の態様の場合、cDNA分子がハイブリッド形成パートナーとして 用いられる。この場合、解的ヌクレオチド配列をあらかじめ知る必要は ない。ゲノムDNAフラグメントとcDNAがハイブリッド形成すると、 cDNA中に与えられていないイントロンが不対ループを形成し(図1 を参照)、これはミスマッチー結合蛋白質に検出されないし、1個の塩 基不対合又は1-4塩基対の付加又は欠失によって起こるミスマッチに ミスマッチー結合蛋白質が結合するのを妨げもしない。

本発明の方法は、多くのより最近考案された突然変異検出検定で共通 に必要な、実然変異態的按股分子の増幅を必要とせずにそのような分子 (DNA又はRNA)を検出することができるという利点を有する。本 発明は、1個又はそれより多い野生型機的ヌクレオチド配列に指摘的な 配列を育する、cDNA分子を含む1値又はそれより多いハイブリッド 形成パートナーオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド分子の機能及 び利用によりこの目標を適成する。ハイブリッド形成パートナーは機的 検取分子とハイブリッド形成することができ、復善対のミスマッチ又は 不対塩器が起こった場合、このミスマッチ又は不対塩基がミスマッチー 助合蛋白質により認識される。

好ましい態様の場合、ハイブリッド形成パートナーは1本銭技能分子

であり、1本額DNAが最も好ましい。

棚的技能分子は、例えば真技細胞、原技細胞、ウィルス、ウイロイド などからのDNA又はRNAであることができる。棚的技能分子は哺乳 環起薬のものが好ましく、ヒト起薬のものが最も好ましい。実際は"棚 的" 技能分子のメクレオチド配列又は起薬に制限はない。

付加又は欠失の小さなフレームシフト突然変異も、ミスマッチ・結合 最白質が結合するような方法で野生型配判と対合する配判を生ずる。例 えば E. コリMutSに基づく修復系(Radman. M. et al., Annu, Rev. Genet. 20:523-538(1985)) 及びストレプトコックス ニューモニアエ HeXミスマッチ能復系の 両方共、1個の塩基の付加又は欠失から生ずるミスマッチに作用することが知られている。2又は3個の塩基対、ならびに程度は少ないが4個の塩基対の付加又は欠失 は複複されない。後って本発明の方法は1-4個の塩基対の小さな付加 又は欠失突然変異の輸出に有用である。

2本額(da) DNA中の特定の1個の熔蓄の突然変異を検出する検定の場合、2個の実然変異DNA検のそれぞれに1個の熔蓄を施いて相構的である2個の野生型ハイブリッド形成パートナー配列を用いるのが、1個のハイブリッド形成パートナーのみを用いた場合と比較して検定の感度が2倍に向上するので好ましい。しかし検定は十分感度が良く、感度が2分の1に低下(2個のハイブリッド形成パートナーを用いる場合に比較して)しても本方法の有用性は低下しないので、2個のDNA領の1個のみに相傾的な1個のハイブリッド形成パートナー配列を用いることもできる。

Blol. 21:101-141(1978))により開示されている。 別の場合RNAハイブリッド形成パートナーは、細胞の天然の監物として、例えばmRNA分子として単離することができる。RNA又はcDNAハイブリッド形成パートナーは組み替えDNA法によっても開製することができる。(例えばGreen et al. Cell 32:681(1983)を参照)。DNAハイブリッド形成パートナーは 当該技術分野における熟練者に容易に明らかになる多様な供給駅のいずれからも、例えば天然に存在するDNAの創限エンドヌクレアーゼの新又は化学的切断により顕製することができる。

E. コリMutSが16塩番のヘテロ2本種に結合し(JIricn y et al. 同上)、フットブリント 法でMutSにより保護されるヘチロ2本種の大きさが8-12塩番種の小ささである(Su、S-S。 et al. Proc、Nati、Acad、Sci、USA83:5057-5061(1986))ことも考慮すると、本発明のハイブリッド形成パートナーの大きさの下限は約10ヌクレオチドである。合成経費を安く保ちなからハイブリッド形成の忠実度を増すために、より大きなハイブリッド形成パートナー、好ましくは約20-約100タクレオチドが行ましい。オリゴヌクレオチド合成の経費を考慮し、より好ましいオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーは約20-約40ヌクレオチドを有する。本明細書に記載する組み替え法を製造に用いることができるので、ハイブリッド形成パートナーの大きさに上限はない。従って別の路径の場合、cDNA分子そのままがハイブリッド形成パートナーである。

本発明の方法で用いるために、ハイブリッド形成パートナー配列は影

特表平7~500493 (フ)

例えばMutSなどのミスマッチ-総合置白質はすべての可能なミスマッチに等しい効率で総合しないので(Dohat. C. et al. 1985、周上:Jones, M. et al. 1987、関上)、ある機の概的配列の場合は問題の機械における同様に相補的なハイブリッド形成パートナーを調製し、与えられたdsDNA野生型配列から2個の可能なミスマッチの同方を形成して2個の突然変異の少なくとも1個を検出することが必要である。

ハイブリッド形成パートナーは、1億より多い塩基対がミスマッチしているより大きな傷的配列に葡萄的な1億の過使したポリヌクレオテドセグメントであることができる。別の場合、値的DNAの1億のフラグメント上で的30塩基か又はそれ以上隔てられた2億の突然変異を、それぞれが1億の値的フラグメント上の別々の配列とハイブリッド形成する2億か又はそれ以上の億別のハイブリッド形成パートナーを用いて検出することができる。

糖様の1つにおいて、傾的配列に相続的なハイブリッド形成パートナーの領域は、ハイブリッド形成可能部分がその中でミスマッチー結合蛋白質がミスマッチを認識して結合する少なくとも的30メクレオチドの安定なヘテロ2本機を形成するならば、3 又は5 宋端にて非ハイブリッド形成配列によりフランキングされていることができる。

RNA又はDNAハイブリッド形成パートナーは多様な層知の方法で調製することができる。健康の方法を用いた化学的オリゴヌクレオチド 合成によりオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを調製するのが最も好ましい。オリゴヌクレオチドの合成法は、例えばWu、R、。

c(al. Prog. Nucl. Acid. Res. Molec.

定可能な形態であるか、より钎ましくは固相但体又はキャリヤー上に固 定されている(図3を参照)。ハイブリッド形成パートナーの固定可能 な形態は、一般にハイブリッド形成反応の後に簡単に固定することがで きる形態である。最後にハイブリッド形成パートナーが固定される方法 は本発明に重要ではなく、ハイブリッド形成パートナーと集的複数配列 の間で形成されたハイブリッドがハイブリッド形成パートナーの性質に より固定されれば、利用できるいずれの方法を取ることもできる。

固定された形態でハイブリッド形成反応に導入される場合、ハイブリッド形成パートナーは、ハイブリッド形成パートナー及びそれと結合する。 反応耦合物のいずれの成分も、後で残りの混合物から単粒又は分離する ことができるようないずれの適した形態であることもできる。分離は遠 心、維通、クロマトグラフィー、デカンテーションなどにより行うこと ができる。

当該技術分野における通常の無触者は、本発明に従って有用な固定ハイブリッド形成パートナーの多様な組成及び形状が分かるであろう。例えばハイブリッド形成パートナーは凝集又は他の場合沈殿させる、不常性材料、ポリマー又は担体に結合する、あるいはアガロース又はポリアクリルアミドなどのゲル中に閉じ込めることができる。(Meth. Ensymol. 128:635(1868): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67:807(1970))。最も好ましいのは、ハイブリッド形成パートナーが共有結合又は非共有結合により結合又は固定された固体担体である。過度に安定で強い結合を与える方法を用いた要等による非共有結合が行ましい。これは又、ハイブリッド形成パートナーへのアミノ作的基を用いても行うことができ、アミノ権

齢基を用いてハイブリッド形成パートナーを簡体性体 (例えば展又はフィルター) に "ひっかける (hook)" 又は轄会する。所望のオリゴヌクレオチド又はポリスクレオチドを選ばれた関体性体に符合する方法は 最底技術分野における通常の熱雑者に展知である。

"問相担体"はオリゴー又はポリヌクレオチドを結合することができるいずれの担体も意味する。周知の包体又はキャリヤーには天然又は変性セルロース、パリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、ポリアクリルアミド及びアガロースが含まれる。実際に担体材料は、勘定されたハイブリッド形成パートナーが繋的核散分子とハイブリッド形成パートナー一幅的ポリヌクレオチドハイブリッドに終合することができれば、いずれの可能な検過的形状であることもできる。かくして担体形状は兼位子、ビーズ、多れ質及び不適適性ストリップ及び譲、試験管及びミクロタイタープレーなどの反応容器の内表面などを含むことができる。好幸しい担体にはニトロセルロース円板又はストリップが含まれる。当該技術分野における熟練者はオリゴー又はポリヌクレオチドハイブリッド形成パートナーを結合するための多くの他の適した担体を知っているか、又は日常的実験によりそれを知ることができるであろう。

ニトロセルロース験上にハイブリッド形成パートナーを吸着する肝ましい方法は、ハイブリッド形成パートナーの排放にヨー化ナトリウムを 飽和させ、アリコートを験上にスポット又は連過することを含む (Br esser <u>et sl</u>., <u>DNA</u> 2:243 (1983))。 別の 場合ハイブリッド形成パートナーをグリオキサル (1M以下) で処理し、

ド形成パートナーの3 とドロキシ末端を適日・未酸塩で酸化し、アミン又はヒドラツド基を有する担体とのショフ塩基形成によりカョブリングすることができる(Gilham, P. T., <u>Method, Ensymol</u>, <u>21</u>:191-197 (1971): Hansske, H. D., <u>et al</u>, <u>Method, Enzymol</u>, <u>59</u>:172-181 (1979))。 水技部位を有する担体はシアヌル酸塩化物と反応させ、その後ポリヌクレオチドと反応させることができる(Hunser, H. D. <u>et al</u>, <u>Biochim</u>, <u>Biophys</u>, <u>Acta</u> <u>653</u>:344-349 (1981))。

一般に、観的配列に相補的な配列を試料核酸にハイブリッド形成するために利用できれば、いずれの方法もハイブリッド形成パートナーの固定に用いることができる。特定の方法又は材料は本発明に重要ではない。直接固定ハイブリッド形成パートナーを用いる代わりに固定可能形態を用いることができ、達成能がより遠い接液中でハイブリッド形成設施を行うことができる。そのような競様の場合典型的に、固定形態の反応パートナーに提出すると反応パートナーと安定な共有結合又は非共有結合を形成して固定形態となることができる反応性都位を含むハイブリッド形成パートナーが用いられる。ハイブリッド形成パートナー中のそのような反応性部位は、固定反応パートナーとして働くアビジン又は抗体などの結合物質と特異的非共有結合が可能なピオチン又はハブテン部分などの結合部位である。

基本的にいずれの物質の対も安定な結合、すなわちその後の検定段階、 主に分離及び被出股階の間、実質的にそのままで残る結合又はカップリ ングを形成する相互作用のための適した鉄和性を示す反応性郵位/反応 特表 平7-500493 (8) その世典上に乗者させることができる。 真空下の80で近辺にて約2-3時間ペーキングすることによりハイブリッド形成パートナーを認定することができる (Thomas, P. S., Meth, Ensymol. 100:255)。

オリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーの共有給合理定も行 うことができる。共有結合職定で有用な多数の担体材料及びカップリン グ法が知られている。例にはカーポジイミド又はカルボニルジイミダゾ ールにより活性化されたリン酸基を介したホスホセルロースへのカップ リング (Bautz, B. K. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:400-408 (1963); Sh ih. T. Y. et al. . Biochemistry 113:3 411-3418(1974))、又はm-ジナゾベンゾイルオキシメ チルセルロース上のジアゾ基のハイブリッド形成パートナーのG及びT 機器との反応 (Noyes, B. E. et al., Cell 5:3 01-310 (1975) : Reiser, J. et al., Bio chem. Blophys, Res. Comm. 85:1104-11 12(1978))が含まれる。多糖担体は、水体性カーボジイミド語・ 性化によりオリゴヌクレオチドの末端リン酸基と担体のヒドロキシル部 分の間で影成されるホスホジェステル雑合を介して(Richwood, D. . Biochim, Biophys. Acts 289:47-5 0(1972))、又はオリゴヌクレオチド上の攻核部位とシアノゲン「 プロミドー活性化担体のカップリングにより(Arndl-Jovin. D. J. et al. . Eur. J. Blochem. 54:411-418(1975)) カップリングすることができる。 さらにハイブリッ

性パートナー対を含むことができる。ハイブリッド形成パートナー上の 反応性部位は"始合部位"と呼ばれ、反応パートナーはそれが共有又は、 非共有結合を形成する"給合物質"と呼ばれる。

態様の1つにおいて、絡合都位はハイブリッド形成パートナーの非ハ イブリッド形成都分に存在し、ハイブリッド形成パートナーの化学的様 節の結果であることが好ましい。ヌクレオチド配列内に存在する結合部 位の例は、プロモーター蛋白質により結合することができるプロモータ 一配列、リプレッサー蛋白質により飲合することができるオペレーター 配列、又は特異的依体により結合することができる修飾タクレオチド、 例えば5-プロモデオキシウリジン又は5-ヨードデオキシウリジン (美国特許出額第2、125、964号明報書)、チミングリコール (Rajagopalan <u>et al., Radiat, Res. 9</u> 7:499-510 (1984) : Hubbard, K. et al. Radiat. Res. 118:257-268 (1989)) である。 オリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーの化学的保飾により 導入される結合部位は特に有用であり、通常特異的結合対の1つのメン パーをハイブリッド形成パートナーに結合させることを含む。その中か ら遊ばれるべき有用な結合対にはピオチン/アビジン(卵白アビジン及) ぴストレプタビジンを含む)、ハプテン(又は抗原)/抗体、炭水化物 **ノレクチン、酵素/阻害剤などが含まれる。給合対が蛋白質メンバー及** び非蛋白質メンバーを含む場合、蛋白質メンバーはハイブリッド形成の 変性条件下で不安定なので非要白質メンバーをハイブリッド形成パート ナーに結合するのが適常好ましい。好ましい系は、ハイブリッド形成パ・ ートナーをピオチン又はハブテンに結合し、それぞれ固定アビジン又は

状ーハプテン抗体似薬を用いることを含む。

翻定可能形態でハイブリッド形成パートナーがハイブリッド形成反応 に導入される場合。それに被く形成された2本能の間定及びミスマッチ 一特合蛋白質ならびに検出のための試薬の影和の歌階は、いずれの所望 の順序で行うこともできる。創定及びミスマッチ一結合蛋白質ならびに 能の試験の添加は、必要な試電及び材料の関時の影加、あるいは洗浄又 は分離設階の介在する、又は介在しないいずれかの順序の順次添加によ り行うことができる。順次影加に従う場合もちろん、形成されたハイブ リッドを過始和し、ミスマッチー結合蛋白質及び検出試底との特互作用 を招寄しないように、加えられる試薬の濃度を考慮する。

好ましいミスマッチー結合蛋白質は、1本酸ポリヌクレオチド又は完全に対合しているハイブリッドを有意に辨除し、ハイブリッド形成パートナーと相構的な額的試料核酸の間で形成されたDNA-DNA (又はDNA-RNA) 塩蓋対ミスマッチハイブリッドと結合する能力を有することを特徴とする。好ましい態像の場合、B. コリからの本来のMutS雇白質やのままを用いる。しかし本明報者で用いられる"ミスマッチー結合蛋白質"という用題は、本来の蛋白質そのままの機能的誘導体も含むものとする。"機能的誘導体"は、本発明に従い、ミスマッチ核酸ヘテロ2本機に結合する能力を保持している蛋白質の"フラグメント"、"変異体"、"類似体"又は"化学的誘導体"を意味する。

ミスマッチー特合蛋白質の"フラグメント"は、分子のサブセット、 すなわちより短いペプチドを言う。最白質の"変異体"は最白質全体又・ はそのDNA-ハイブリッドー結合フラグメントに変質的に類似の分子

により修飾することができ、後出可能な響敵をしたアビジン又はストレ プクビジンを検出目的の結合パートナーとして用いることができる。

ミスマッチー結合蛋白質の好ましい化学的誘導体は、ミスマッチー始 合蛋白質と他の蛋白質("融合蛋白質パートナー")の間の融合蛋白質 であり、その場合他の蛋白質が構造的又は機能的特数を与えて融合蛋白 質を検出に有用なものとする。例えば融合蛋白質パートナーは、検出目 的で抗体が始合することができる抗原性部位に寄与することができる。 ミスマッチー結合蛋白質又は機能的誤解体及び酵素の間の融合蛋白質は、 例えば当該技術分野において周知の通り融合蛋白質の酵素部分が色素原 高質からの着色反応生成物の彩成を触体する能力があるために、検出の ためのより直接的な手段を与える。

好ましい融合蛋白質は、MutS又は銀鉛的酵母体と酢素8-ガラクトシダーゼの間の融合蛋白質である。この態様の場合、固体担体への8 結合の存在をこの酵素の色素原基質を用いて検出することができる。そのような基質の例はNABG(ナフトール AS-B1-8-d-ガラクトピラノシド)である。

ミスマッチー結合蛋白質の融合蛋白質素等体は、遊線技術分野において開知の方法を用いて開設することができる(例えばSambrook.

J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. NY. 1989を参照)。

本検定の方法に有用な蛋白質の選択は、当該技術分野における過常の 無複者が従来の方法を用いて行うことができる。従って例えば本発明に 特表平7-500493 (9) キョウ・ミスマッチー結合蛋白質、例えばMutSの皮質体は、当該技

所分野において周知の組み替えDNA技により顕彰することができる。
MutSの好きしい機能的調準体は、P. コリMutSの他のパクテ
リア種における関集体、例えばサルモネラ チフィムリウムのMutS
独白質(Lu、A. L. ct al. 同上: Habet L. T. e
t al. 同上: Pang、P. P. et al. 同上) 又はスト
レプトコックス ニューモニアエのhexA蛋白質(Priebe S.
D. et al. 同上: Haber ct al. 同上) である。
さらにMutS又はHexAの可能な実践関繁体、例えばヒト、マウス
又はハムスターDNAにおいて関定された相関配列によりコードされる
ものも用いることができる(Shimada, T. et al. J.
Biol. Chem. 264: 20171(1989): Linton,
J. et al. Molec. Cell, Biol. 7:3058-3072(1989): Fuji, J. et al. J. BiolC

ミスマッチー物合蛋白質の"化学的概算体"には、散合蛋白質の場合のような追加された範囲のアミノ酸を含む、適常は蛋白質の一部でない付加された化学的部分が含まれる。ペプチドの共有結合による経路は本発明の範囲内に含まれる。そのような修飾は、蛋白質の傾向とされたアミノ酸技器を、選ばれた関策又は末端残器と反応することができる有機 携帯刺と反応させることにより分子中に導入することができる。そのような誘導の例はハプテン一條終であり、その場合トリニトロフェニルなどのハプチン性器が蛋白質と共役し、検出可能な機能をした検出目的の結合パートナーの傾的として働く。別の場合蛋白質をビオチン基の共役

hem. 264:10057 (1989)).

おいて有用なミスマッチー結合蛋白質の存在に関して供給原を評価する 場合、Jiricny et al、(その参照文献の記載事項は引用 することにより全体が本明報書の内容となる)により記載されているよ うなミスマッチー結合検定を行うことができる。フィルター結合検定 (filter binding assay) を用いるのか好ましい。 オリゴヌクレオチドヘテロ2本種の興製のために、好ましくは16塩基 のオリゴヌクレオチドをキナーゼ反応も用いてススPで、及びT4ーポリ ヌクレオチドキナーゼなどのキナーゼを用いてガンマー**P-ATPで 裸靴する。その後5゜~裸臓オリゴヌクレオチド(これはー20℃で保 存できる)を、1個の復基対ミスマッチを育する相補的オリゴヌクレオ チドと標準的条件下でアニーリングする。アニーリングされた16塩基 対ヘテロ2本稿を過剰の試験するべき重白質と席合し、水上に30分間 保つ。その後院合物を検定級街後中で予備提高させたニトロセルロース フィルターに連用する。穏やかに数秒間吸引し、フィルターを氷ー冷検 定模桁波で強力に洗浄する。その後フィルターを空気乾燥し、シンチレ ーション彼に態衡し、カウントする。フィルターに付着した蛋白質のた めに、フィルター上のカウントはすべて推定ミスマッチー結合量白質の 結合に帰することができる。そのような要白質がない場合、機能された オリゴヌクレオチドヘテロ2本鏡はフィルターも海通する。従ってその ような簡単な検定を用いることにより、本発明の方法で有用なミスマッ チー箱合葉白質を容易に快出し、選択することができる。

当該技術分野において鉄知の違り、程々のハイブリッド形成条件を本 発明の方法で用いることができる。典型的にハイブリッド形成はわずか な高温、例えば約35℃-75℃、通常約65℃にて、約6~8のpH で着したイオン譲渡(例えば2米 SSC、ここで1米 SSC=0.15Mの塩化ナトリウム及び0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH7.0)の硬物液、ウシ血液アルブミンなどの蛋白質、Ficoll (Pharmacia Pine Chemicals Piscataway NJにより販売されているスクロース及びエピクロロヒドリンのコポリマーを展定する原理)ポリビニルピロリドン、及びコウシ物 絶又はサケ特子からなどの変性異常 DNAを含む熔液中で行われる。ハイブリッド形成が起こるために必要な試料及びハイブリッド形成パートナー値の間の機械性の確度は、条件の素確度に依存する。ハイブリッド形成の確度及び特異性は、以下の主条件により影響される。

- 1. 核酸試料の純度。
- 2. G~C性基対の含有率:G~C性基対はA-T又はA-U場差対より高い熱安定性を示す。従ってG~C含有率の高いハイブリッドは高温で安定である。
- 3. 相関塩基配列の長さ:例えば8塩基より扱いなどの短い塩基配列は多くの放散において繰り返しの可能性が高い。そのような短い配列を含むハイブリッド形成においては特異性が低いか、又は得られない。本見明のハイブリッド形成パートナー配列は、オリゴヌクレオチドの場合少なくとも約30塩基で最高約100塩基、cDNA分子の場合それより多くさえ含むことが好ましい。
- 4. イオン糖度:再アニーリングの速度は、インキュペーション溶液 のイオン糖度の増加と共に増す。ハイブリッドの熱安定性も向上する。
- 5. インキュペーション製度:最適用アニーリングは、与えられた2 本鉄の耐点(Tm)より低い約25~30℃の進度で起こる。最適より

れる。取者の場合、ハイブリッド形成パートナーを約10より高いpH に暴奪するのを避けることにより加水分解を抑制することができる。R Nasesは、ドヂシル破験ナトリウム、アウリントリカルボン酸、リポヌクレオチドパナジル雑体、ヘパリンジエチルピロカーボネート及び哺乳原供給源から単茂された蛋白質性RNase服務剤などの物質の存在により有効に限害することができる。

制物的検出は、ミスマッチー結合蛋白質又はミスマッチー結合蛋白質に共促した反応性部分、あるいはミスマッチー結合蛋白質の融合蛋白質パートナーに特異的な結合パートナーを用いる方法を意味する。ミスマッチー結合蛋白質がMulSの場合、好ましい結合パートナーは优~MulS就体(又はその优原ー結合フラグメント)である。

特 表 平 7-500493 (10) かなり低い温度でインキュペートすると、制造性の低い協議配列をハイ

6. 被敵震変及びインキュペーション時間:最常反応をハイブリッド 形成に駆動するために、ハイブリッド可能は科牧敵又はハイブリッド形成パートナー技能の1つが過剰に、通常100~倍運動かそれ以上で存在する。

ブリッドさせる.

- 7. 変性試験:ホルムアミド及びウレアなどの水素雑合切断試際の存在は、ハイブリッド形成の繁雑度を増す。
- 8. インキュペーション時間:インキュペーション時間が扱い程ハイ ブリッド形成はより完全になる。
- 9. 体教学除試施(volume exclusion agent): デキストラン及びデキストランサルフェートを例とするこれらの試置が 存在すると、ハイブリッド形成収分の有効施皮が向上し、それにより得 られるハイブリッド形成の速度が増すと思われる。

通常、ハイブリッド形成の場合に選ばれる温度条件は、形成されたハイブリッドへのミスマッチー結合蛋白質の結合、又はミスマッチー結合蛋白質の結合しない。使ってミースマッチー結合蛋白質及び結合パートナー以底の結合及降及び標準後出及際は、ハイブリッド形成取除の充丁後に行う。通常反応混合物を約3 ℃一約40℃の範囲の選底とし、その後ミスマッチー結合蛋白質及び違如の試験の結合ならびに被出及階を行う。

RNAハイブリッド形成パートナーを用いた特定の検定の場合、RN Aがホスポジエステル結合のアルカリ加水分解により、又はリボヌクレ アーゼ(Rnases)の存在により部分的に分解されることが予想さ

本見明の方法で有用な抗体試験のいずれも抗体全体、抗体フラグメント、多級能抗体試験体(polyfunctional antibody aggregates)、あるいは一般に抗体からの1個又はそれ以上の特異的結合部位を含む物質を含むことができる。抗体は免疫グロブリン イソ型、例えば1gG、1gMなどのいずれかであることができる。そのような抗体の抗聚一結合フラグメントのいずれか、例えばFab'又はF(ab')ョフラグメントを用いることもできる。さらに免疫グロブリン又はそのフラグメントの凝集物、ポリマー、誘導体及び共役体を場合により用いることができる。

依体試養のための免疫グロブリン供給悪は、従来のポリクローナル依 血情の関制、又はモノクローナルあるいはキメラ抗体の調製などのいず れの方法によっても得ることができる。抗血情は、マウス、ウサギ、モ ルモット又はヒツジなどの動物をMutS蛋白質などの適した免疫順で 免疫化することを含む十分に確立された方法により得ることができる。

別の場合結合パートナーは、ミスマッチー結合蛋白質と融合した融合 無白質パートナー、例えば8ーガラクトンダーゼに特異的な抗体である ことができる。さらにミスマッチー結合銀白質分子に共及したハプテン 器に特異的な抗体を用いることができる。他の結合パートナーは、ミス マッチー結合蛋白質がビオチンの付加により修飾された場合のアビジン 又はストレプタビジンであることができる。さらに別の態機の場合、結 台パートナーは免疫グロブリン分子に結合する性質を育する非免疫グロ ブリン蛋白質、例えば当該技術分野において周知のスタフィロコッカス のプロテインA又はストレプトコッカスのプロティンGであることがで きる。結合パートナーはそれ自身が検出可能な報識をされているか、又 は他出可能な根離をされた第2館合パートナー、例えば第1放体に特異的な第2教体により間接的に検出することもできる。かくしてウサギー放・ミスマッチー第合置白質技体が第1能合パートナーとして作用する場合、観離されたヒツジー状・ウサギ免疫グロブリン技体は第2雑合パートナーである。他の維持の場合、ミスマッチー結合複白質に特異的質パートナーの存在により生成される信号を、その融合蛋白質に特異的で検出可能な模様をされた技体(例えば抗ーβーガラクトシダーゼ執体)を用いた反応により地経する。当該技術分野における過常の熟練者は、不必要な実験を行うことなく当該技術分野で周知の従来の方法を用い、そのような第1及び第2結合パートナー系として可能な多くを考案することができる。

さらに別の意味の場合、結合パートナーはE. コリ、S. チフィムリウム又は他の供給薬から得たMutし版白質(Grilley、M. et al.・J. Biol. Chem. 264:1000-1004(1989):Modrich、P. . 1989、岡上:Lahue et al. . 1989、岡上) あるいはその機能的誘導体であることができる。好ましい機能的誘導体はMutしと検出の容易な第2融合パートナー蛋白質、例えばβーガラクトシダーゼとの融合蛋白質である。分子量が90kDaの特製Mutし蛋白質はATPの存在下でMutS及び検験へテロ2本輪の複合体に選択的に結合することが知られている。MutLはミスマッチー含有ヘテロ2本線又は避難のMutSに重複は結合しない。MutL程白質はパクテリア中でクローニングされ、発表された(Pans et al. . 同上)。かくして本発明に従って用いる場合、好ましくは検出可能な問題をされた影態のMutL質白質又は

y Techniquea, The Endocrine Socie ty, March 1986, pp. 1-5, 46-49及び68-7 8) を含む従来の多様なイムノアッセイのいずれを用いても行うことが できる。

好ましい態様の場合、MutS-特異的抗体又は抗体フラグメントに、 それを酵素に結合することにより検出可能な機能をし、EIA又は酵素 一時合イムノソルベントアッセイ(ELISA)で用いる。今度は後で この酵素を、例えば分光光度制定、盤光制定又は最も好ましくは模葉に よる手段で検出できる化学的部分を与えるような方法で募賞に暴露する。 基質は模数で見ることができる反応生成物を生成する色素限基質である ことが好ましい。

MutS-特異的抗体などのミスマッチ・結合蛋白質のための結合パートナーに検出可能な標準をするために用いることができる酵素には、アルカリ性ホスファターゼ、ホースラディッシュパーオキンダーゼ、グルコースー6ーホスフェートデヒドロゲナーゼ、スクフィロコッカスヌクレアーゼ、デルターVーステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファーグリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ、リポヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースー6ーホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが含まれるがこれらに限られるわけではない。

結合パートナー、例えばMutSー仲異的抗体を放射性領機することにより、ラジオイムノアッセイ(RIA)を用いて固体阻体に結合したMutSを検出することができる。放射性同位はは、ガンマカウンター

待表平7-500493 (11)

機能的制率体はATPの存在下で突然変異検出検定に加えられる。その 数補金MUILLを検出する。別の場合、上記の週り非報識MUILLを第 1 箱合パートナーとして用い、その後MUILに給合する複数第2 結合 パートナーを用いるか、あるいは非保難第2 結合パートナーを用いてから検出可能な態態をした第3 箱合パートナーを用いることができる。 MUILのための第2 箱合パートナーはMUILに形で記載した乗り、MUILのための第2 箱合パートナーはMUILに特異的な抗体、MUILに共役したパプテンに特異的な抗体、ビオチンがMUILに共役している場合アピソン又はストレプタピジン、MUILの融合パートナー蛋白質に設する抗体などであることができる。

上記の第1又は第2結合パートナーが放体である場合、後出はエンザイムイムノアッセイ(EIA)(Voller、A. Disenos tic Horizons 2:1-7, 1978, Microbio iogical Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD: Voller、A. et si. J. Clin, Pathol. 31:507-520(1978):米陽再発行特許第31,006等明和書:美国特許第2,019,408等明報書:Butler、J. E., Meth. Ensymol. 73:482-523(1981):Masgio, E. (ed.)。Ensyme Immunoassay、CRC Press, Boca Raton, FL, 1980)又はラジオイムノアッセイ(RIA)(Wientraub、B., Principles of Radiolmmunoassays、Seventh Training Course on Radioligand Assa

又はシンチレーションカウンターを用いるなどの方法で、あるいはオートラジオグラフィーにより検出することができる。本発明の目的に特に有用な同位体は: *H、!*! [、**S、!*C、及び好ましくは!**[である。

第1又は第2的合パートナーを蛍光化合物で標識することもできる。 蛍光保職した抗体を適した被長の光に暴露すると、その存在を蛍光によ り検出することができる。最も普遍に用いられる蛍光保職化合物には、 フルオレセインインチオシアナート、ローダミン、フィコエリトリン、 フィコシアニン、アロフィコシアニン、ローフタルアルデヒド及びフル オレサミンかある。

第1又は第2結合パートナーは、それを化学発光化合物にカップリングをせることにより検出可能な無難をすることもできる。その後化学発光一付加抗体の存在を、化学反応の経路で生ずる化学発光の存在を検出することにより決定する。特に有用な化学発光振識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマチック(theromatic)アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びオキザレートエステルである。

同様に、生物発光化合物も第1又は第2結合パートナーの標準に用いることができる。生物発光は、生物系で見られる程度の化学発光であり、その場合触媒蛋白質が化学発光反応の効率を増加させる。生物発光蛋白質の存在は発光の存在の検出により決定される。標準の目的に重要な生物発光化合物はルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンである。 後定するべき試験試料はいずれの問題の媒体中にあることもでき、一般に医学的、敏医学的、環境的、栄養的、又は工業的に重要な試料であ る。特にヒト及び動物以料及び体液を、それらが放散を実製できる細胞 を含んでいれば、本方法で検定することができる。好ましい供給無には 血液、特子、他の組織、母乳、尿、解等経液、等疾、使、解吸引物(1 ung aspirates)、咽喉スワブ、性器スワブ及び輸出液、 液薬スワブ及び具毛薬吸引物が含まれる。

試料が主に細胞中に天然に存在するDNAなどの2本酸状設を含む場合、最初に試料を処理して細胞から状設を放出させるが、それは機械的 破壊(例えば液結/乾燥、無砕、音波処理)、物理的/化学的破壊、例 えば洗剤処理(例えばTriton、Twaen、又はドデシル放設ナ トリウム)、長速圧ショック、熱又は資素ライシス(リソチーム、プロ テイナーゼK、ペプシンなど)により行うことができる。

本発明の方法に従い、放出d s D N A を制限エンド 5 クレアーゼ酸素により切断し、所覚の配列を含む検定に適した長さのフラグメントを形成することができる。制限酵素の選択は所望の棚的配列、及びその配列の開倒に存在する適した制限酵素迅速感位に依存する。当該核常分野における過常の熟練者は不必要な実験を行わずに部位を同定し、酵素を選択することができるであろう。例えばS a m b r o o k 、 J 、 c t 。 a 1 . . . 四上を参照せよ。

制限即素増化の酸、療施水中の加熱又はアルカリ処理(例えばり、1 N水酸化ナトリウム)により核酸の変性を行うのが好ましい。得られる 試験媒体は1本額の形態で核酸を含み、その後それを本発明の方法に従っ て検定することができる。

本発明の方法はヒトにおける特定の突然変異の検出の方法及びキット も提示する。下記の表1は、本発明の方法を用いて検出できるヒトの実 特表平7-500493 (12) 然変異の一葉痩を示すが、これらに振られるわけではない。その記載事項が引用することにより本質細胞の内容となるCooper, D. N.
et. al. · Hum, Genet. 85:55-74 (1990) 6 参照せよ。

| 8 | | | | | | | | | |
|---|---------|-----------------|---|-----|------------|---------|-----|-------|-----|
| | İ | なる。 | ĸ | | | | | | |
| | 十四元 | 事務所代 | 71/BEC | 8 | | # | • | - | ŀ |
| ADA 1758 | | | | ŀ | | | | | ١ |
| 100 | Š | 96-000 | Arg-61n | 101 | Bonthron | į | ; | ; | ; |
| APA NAM | ¥O¥ | AM-AGA | Cv8-1 | : | | 1 | ٤, | Š | = |
| _ | ADA | | | | | 3 | • | Ξ | ä |
| | 1 | | | ě | Valerio | O | • | = | |
| - | 5 | 9000-100 | Arg-Tro | 2 | Akeson | 787 | . : | | |
| | ş | 5 | Aro-91 | 1 | 4 | 3 | 3 | 1623 | = |
| AVA XZE | YOY | 2 | | | AKEBOH | 200 | 2 | 16791 | = |
| A DA 328 | 4 | | | 2 | AKESON | PNAS | ä | 5963 | = |
| 7747-144-1444 | § : | 35-35 | Pro-cin | 293 | Hirshhorn | Jet | = | | : : |
| 12Y2 | | 000-100 | Arg-tro | 2 | Reterent | - | | | 6 8 |
| | CAZINB | ပ္ပင္ပ ပင္ပင | Pro-Ard | 426 | Hatten | | : | | • |
| 新列动形成 | CA218B | AGC-ACC | | | 200 | 2 | = | 388 | Ç |
| 世紀常町 | CAZINA | ATC110 | | | Manot room | 3 | _ | 1653 | 2 |
| 世紀の | | | 17 - 17 - 17 - 17 - 17 - 17 - 17 - 17 - | - | ABOT | HAS | 2 | 1600 | 98 |
| | | 170 | - | = | Clobernan | JCI | = | | : |
| | | 2012-010 | 741-Ced | 112 | Spalser | NE.TH | : | ì | :: |
| | 242143 | 24-24 | Val-Leu | 1 | Spales | MP.73 | | | 2 |
| | CAZIHB | AAC-AGC | Asp-Ser | : | Rodrigues | į | :, | | = : |
| ・シェラーセイ欠之間 | YP Y | GAT-CCT | Asp-01* | | 74-14 | | • | 2 | - |
| アルドラーゼロ欠乏は | ALDB | teer-cer | 110-014 | | | 2 | = | 23 | = |
| 71041-01 | | 2000 | | 2 | | 100 | Ç | ĩ | = |
| 71047-02 | | 10.00 | | 2: | À | JCI | 2 | 1706 | 2 |
| 71048-03 | | | | 2: | We 11 ace | JCI | = | : | = |
| 一 三年 二年 | | 100 | | • | Wallege | NIIG | 2 | 2 | : |
| - 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 | | | | = | Skriver | 200 | | 9900 | = |
| レンチャロンカン医をある | | | Ard-W18 | ž | Skriver | 200 | - | 9900 | : |
| レンチャロングンロチルラ | 2 | | Arg-cys | | Ouchange | WAR | = | | : |
| 200 C C C C C C C C C C C C C C C C C C | | | 3-01- | - | 6 | 780 | | 2 | |
| 12X=121 | | 1 | 27-01 | 5 | Bock | Bloches | _ | | : |
| 1111111111111111111111111111111111111 | | 40CY-YCY | - THE-12 | ~ | Daves 1-K. | loon | : | | :: |
| ・ノト・ロンハン巨名の前 | Ė | 101-101 | Arg-Cys | 33 | The La | Blood | : 2 | | :: |
| ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | | CT-CAT | Arg-Alle | 2 | the In | Blood | | | :: |
| アントトロンアン自欠利氏 | | -64 | Arg-Pro 3 | 2 | 23 | 180 | | | :: |
| | | | | | | ; | | | 2 |

ヒトの過位的を扱いす点実践意見

| 2 | İ | XXX | E | - | | # # | * | | |
|-------------------|--------------|-----------|----------|-------|-------------|-------------|----------|----------|------------|
| | が記す | 加米を | 71/配配化 | 8 | * 8 | | | = | |
| 41・7ンチトリブシン火気を | E | 070-070 | Vel-Ale | E | Make to a | 1 | ŀ | | ı, |
| A 1-124 1 1727次の配 | 7 | CCAG-AAG | Clu-Lvs | ÷ | Kidd | Mahma | | | |
| ロコーアンチャンアック大利原 | | 1000 | 20.02 | 3 | Kofter | 1000 | : | 3 | 2 : |
| ローフンチャコアウン欠込度 | ä | GALC-TAC | Lve-Tern | | Est of | Tales Canal | : | ŧ: | |
| ■1-7ンチナリブシン欠名庫 | | 20-50 | Jan-Pro | = | Tabahash (| 2 | :: | | |
| APTXZ | _ | ATG-ACG | | : | 7 7 7 7 7 7 | 2 | 2 : | 15528 | = : |
| T#A1X2K | A POL | GAGE-GAT | 2111 | | | 5 | = | 2 | Z |
| アポラ大乙属 | A 20 | SCAA-TAA | | | Brenette | 200 | 2 | 120 | = : |
| 7.4.10久足区 | A POS | tock-tok | 2 | | 1100 | 2002 | : | 2 | 5 : |
| 145XVB | A 703 | C00-C40 | Arg-61a | 350 | Sorie | PHAS | :: | | :: |
| - テロングル | 2 | toga-76A | Arg-tern | | Young | MEJN | : | | 2 : |
| いっている。 | Ž | acac-1cc | Ard-Cy | | Zuk. | clin ches | : | | 2 |
| 1000 | 2 | acec-yec | Arg-Ser | | ā | Generales | : - | | :: |
| | 2 | 9001-101 | Arg-Cye | Ξ | Z | Genomics | | | : : |
| 100000 | ¥ 66 | 9CAG-AAG | Glu-tys | | Tajira | Jochan | ĕ | | : 1 |
| を見む(インスカンを対象) | N POR | 9000-1006 | Arg-Cys | | Rail | JCI | : | | : : |
| 代展的(インスキン部に称) | 200 | AGGE-AGE | Arg-Ser | | Yoshinssa | Science | | | |
| | THSH | 156-755 | Trp-Sar | | Moller | HECK | : | 1526 | |
| (ME 10 (11 90H) | 148 | 10-10 | 34-Ser | Z | Hanada | PROSE | 9 | 7919 | : = |
| メーラーデンロスを飛行 17 | TREE | פפריכוב | C1y-481 | . 166 | Odawara | Solence | 5 | , | := |
| ユーケーダンロス配供用 田 | CYTY COLLAND | SCCI-ACT | Gly-80r | 200 | Tromb | 380 | 2 | 134 | : I |
| 20元の北京日本の | | ATCG-ATA | Met-116 | 139 | | Code | _ | 1705 | . = |
| | 1416 | ACTY-ACC | | | | Plood | = | 3 | = |
| MXIG-1-26 | 5 2 | 201-0010 | | | | | 2 | 1390 | • |
| BX以子女多位 | : 5 | 201-100 | | | Jagadees | JCBS | 2 | | • |
| KYPATOV-OR CHI | HEE | | _ | ٠. | | PRAS | = | :: | • |
| アクースクサイカイ | HEXB | GG - AC | | _ | | 25 | = | 777 | • |
| GGPDXZG | 0490 | 9447-619 | | | | TANS. | = | <u>₹</u> | |
| GBPDXZE | 2820 | GGAT-AAT | Acr-ben | | ٠. | PRAS | 2 | 21.1 | _ |
| G8 P D X 2 6 | 0490 | CCAG-AAC | 201-100 | | | 2 | • | Ē | |
| C6PD欠之底 | 0490 | 30Y-300 | _ | | Dill Lang | 341 | 2 | 1 | - |
| CBPDXZE | 200 | 五十五 | Ser-Phe | = | Millamy | | 2 50 | | |
| | | | | | | | , | | |

第 1-版

特表平7-500493 (13)

| ## ## ## ## ## ## ## ## ## ## ## ## ## | K . | | 表表 | ĸ | 1 | | P H X | ¥ | | |
|--|----------------------------|------------|-------------|----------|-----|---------------|-----------|----|------|-----|
| December | | 古屋子 | 和茶家化 | 71/推案化 | 8 | C | ١. | • | ¥ | #÷ |
| DAZER | GBPDXZE | 0490 | CCCC-VCC | Gly-Arg | Ξ | Valliamy | PHAS | = | Ė | 1 |
| U.Y.Z.R. G8PD GONT-CAT Nap-liss 1810 On vite Main 15 | CBPDAZE | 26.00 | CCTC-ATC | Val-Yar | 3 | Vulliany | 200 | - | 313 | 2 |
| December | CBPD大芝麻 | 200 | SCAT-CAT | Asp-IIIs | 113 | De Vita | AZIIO | 3 | 2 | : |
| | CGPDXEG | 0490 | BCCC-AGC | Gly-Ser | 3 | Vulliany | MAR | : | = | : |
| 7.57 (122) G.M. Anc-Ance Ani-Ser 170 Turyll Phis. 55 120 120 C.M. Anc-Ance Ani-Ser 170 Turyll Phis. 55 120 C.M. Anc-Coo Prey-Yes 141 Full States Ani-Very An | J-713 (12) | Æ | CCG-CAC | Arg-Gla | 119 | Craves | 1 | • | 23 | = |
| 7.7. (2.27) G.B. TTG-TCC Lau-Pro (44 Fau-)] REJN 118 118 118 118 118 118 118 118 118 11 | ゴーシス数(一数2 | Ş | AC-160 | Asn-Ser | 330 | Pauli | PWAS | = | : | = |
| Column C | ゴーシェ語 (2型) | 3 5 | 900-020 | Leu-Pro | = | Peu | REZH | = | | = |
| | J-910 (20) | 5 | 99-59 | Pro-Arg | 5 | Wideosrann | - | 3 | 5 | = |
| | 74177-31992 | Ē | 90-99 | Pro-Ceu | 102 | Kelao | _ | | 3 | : = |
| | 100000000 | 047 | ATGE-ATA | Met-110 | - | Witchell | | = | ; ; | : |
| | 1100円の大学 | T/O | AACE-AAA | Agn-Lys | 3 | Research | PRAG | = | 111 | = |
| | 医 | ₹ | SCTG-ATC | Val-Het | 332 | Dames | PALS | 1 | | |
| | 1000年代の大学 | 4 | AGG-ACG | Acq-The | 9 | Kitchell | PHAS | : | = | |
| | M M M M M M M M M M | TY0 | 139-E | Leu-Pro | 707 | Kitchell | PHAS | | : | : : |
| | 一つくはンコンアクラーを次記機 | ¥672 | CCC-CBC | Arg-His | = | Elinder | 310 | = | 315 | = |
| NEW Color 11-44t 111 14 111 1 | ٠. | HPRT | LCCA-CCA | Arg-Gly | 8 | Wileon | 301 | = | 5 | = |
| X2E HPRT CTC-AC Val-App 113 Davidson Gene 40 X2E HPRT CTC-AC Ser-Ac 103 Cariello ANG X2E HPRT CTC-AC ANG-Los 109 Davidson 71 X2E HPRT CTC-TC ANG-Ser 100 Dibbs 90.0 X2E HPRT CTC-TC ANG-Ser 100 Dibbs 90.0 X2E HPRT CTC-TC ANG-Ser 100 Dibbs 90.0 X2E HPRT CTC-TC CP-TR 100 Dibbs 90.0 X2E HPRT CTC-TC Lu-Tr 100 Dibbs 90.0 X2E HPRT CTC-TC Lu-Tr 100 Dibbs 90.0 X2E HPRT CTC-TC Lu-Tr 100 Dibbs 90.0 X2E HPRT CTC-TC | | 1987 | ATTO-ATC | 116-Mat | 111 | Pul (mort | Non Cenat | = | = | = |
| No. 2 | | Ħ | CTC-CAC | Vel-Asp | 128 | Devideon | Gene | 3 | 5 | : |
| No. 2 | | 1997 | ACCT -ACA | | 103 | Carlello | ZEC | = | 7.7 | = |
| K2E HFF CAT-Cor Nap-Cat 13 Clibbs 14 C | | į | 1CX-174 | Ser-Leu | 601 | Davidson | 151 | = | 316 | = |
| Mark | | E | CAT-COT | Asp-Gly | 200 | Davidson | 310 | ž | 226 | = |
| X2E HPRT CCLATCA Als-Ser 180 Glbbs PRIS 16 1 X2E HPRT CCLATCA Arg-Ver 189 Glbbs PRIS 16 X2E HPRT CCLATCA Arg-Ver 189 Glbbs PRIS 16 X2E HPRT CCTC-TV PR-VAL 189 Glbbs PRIS 16 X2E HPRT CCTC-TV PR-VAL 189 Glbbs PRIS 16 X2E HPRT CCC-TV RS-TY 180 Glbbs PRIS 16 X2E HPRT CCC-CV CLA-Arg 70 Prilamal JCT 18 X2E HPRT CCC-CV CLA-Arg 70 Prilamal JCT 18 X2E HPRT CCC-CV CLA-Arg 70 Prilamal JCT 18 X2E HPRT CCC-CV TAP-VAL 189 Glbbs PRIS 181 X2E HPRT CCC-CV TAP-VAL 181 X2E HPRT CCC-CV TA | | Ē | Ĕ | 7-1-E | 5 | o I bbs | MYS. | ž | 1939 | 2 |
| NAZE HPRT TTG-TCG Law-der 130 clibbs WAS 6 NAZE HPRT CTTC-CTG Arg-Pers 150 clibbs PRAS 6 NAZE HPRT CTTC-CTG Res-Val 180 clibbs PRAS 6 NAZE HPRT CTC-CTG CTG CTG CTG NAZE HPRT CTC-CCG CTG CTG CTG NAZE HPRT CTG-CCG CTG CTG CTG NAZE HPRT CTG-CCG CTG CTG CTG NAZE HPRT CTG-CCG CTG CTG CTG NAZE HPRT CTG-CTG CTG CTG CTG NAZE CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG NAZE CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG NAZE CTG C | | į | 100 - 100 o | A18-56F | 2 | C(pps | PBAS | : | 1314 | = |
| X2E HRIT CTC-CTC TA-11 198 (1bbs Phis 16 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 | | ij | 116-100 | -Cen-Ser | 92 | dibbs | HAS. | = | 1929 | = |
| XZE HRIT CTTC-CTC Pie-val 198 C(bbs Pins 16 1 2 2 2 2 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 | | ž | ACCA-TGA | Arg-Term | 5 | of the | MAS | = | : | = |
| No. | | E | وتلوجونو | -V-1 | | Cibbs | 24.18 | : | | : |
| | | HPRT | TCT-TAT | Cys-Tyr | 203 | Gibbe | PHAS | 2 | | : |
| X2E HPRT 96CC-CCC "C1y-hry 70 Prijmori 371 191 1 X2E HPRT CTA-CCA. Lu-Pro 40 Briddson 371 181 182 182 183 183 183 183 183 183 183 183 183 183 | | HPRT. | ECAT-CAT | W.S.AsD | 203 | Clabs | PHASE | : | | : |
| N.Z.E. HPRT CTA-CCA. Lad-Pro to Davidson JC1 At N.Z.E. HPRT CAC-CAC C17-C1u 69 Onvidson JC1 14 XZ.E. HPRT CAT-CTT ABP-NA 179 Deviden JC1 14 XZ.E. HPRT CAT-CTT ABP-NA 179 DAVID ABP-NA 179 DEVIDEN JC1 14 XZ.E. HPRT CAT-CTT ABP-NA 179 DAVID ABP-NA 17 | | HPRT | 200-2220 | CIV-Arg | 20 | Parliant | | : | : | : |
| XZE HPRT GGG-GAG Gly-Glu 69 Davidson JCI 61 XZE HPRT GGG-GAG Gly-Glu 69 Davidson JCI 61 XZE HPRT GR-LT-N AND 19 Davidson JCI 61 XZE HPRT GR-LT-N AND 19 DAVIDSON JCI 64 XZE HPRT GGG-LT-N AND 19 AND 1 | _ | T DUT | CTA-CCA. | | 2 | Daviden | | :: | :: | :: |
| X2E IPRE GAT-OTT ASP-Val 79 Dayldson JCI 84 | | 1 | CCC-CAG | C14-C10 | : | Dividen | | | :: | :: |
| 大名的 TOTAL T | | 100 | Ch - Ch - | Ach-44 | : | Danie de part | | : | | • |
| | | L | 100 | | . 5 | Did Land | 70 | :: | 2 | |

| E | K 似 似 | | | 10000000000000000000000000000000000000 | * | |
|---|--------------------|--------------|------------|--|------|------|
| | 建压于 包裹 聚化 | TIVERS CO | | = | 0 | = |
| IIPRTAZE | HPR officere | Phe-Val 161 | Day decon | 101. | | 1 |
| はボスファクーを開発 | | Ale-Thr 163 | Kales | | | |
| モリフスナローを食物 | | 3 | Rontor | | | |
| 成プロインスリン会前 | | His-Aen Blo | | | : | |
| ピアウインスリン信託 | | | Ī | | : | |
| 用とロインスカン製料 | INS THEE-THE | Phe-Leu 825 | į | A lebete | : | |
| 成プロインスンン会員 | . INS CCT-CAT | Aro-His | Thibacate! | | | |
| M/04/ソスリン会的 | INS tere-tre | | Anaka | 1 | :: | |
| アログランド大力の | 10K c1CC-0CC | | Stavnezer | Solence | 2 | |
| 元政ケックリンド大人の | ION OTCO-CGG | | Stavnezer | Palence | | Ş |
| LOLR 522 | LOLA TCGO-TCA | | Lebrush | 1100 | : | |
| LOCKAZE | LOUR TAT-TOT | 175-578 | Davis | Cell | | |
| LOCRYZE | LOCA TOCO-TOA | | Cohraca | 780 | | . 6 |
| 不是但所会数 | INSR GAAG-GAG | Lys-010 | Kaderraki | Balence | 3 | : |
| KING COLD | INSR CCAG-TAG | dla-Term | × | Solence | 200 | |
| メーンケックシン研究を記るという | SCKD OTAC-AAC | Tyr-Yen | • | Jei | _ | 5 |
| | COLLAI CONTINUE | dly-cys 148 | | JBC | 762 | 2 |
| を対象する。 (1) | COLLAI COOP-TOP | CJy-Cys | Lebbard | H | • | |
| A MARTINE (1) | COLLAZ GGT-GAT | Cly-Aep | Baldvin | 380 | 26. | 8 |
| 中部事件を持つの | COLIAL CIGA-AGA | | Bateran | JBC | 36 | 1627 |
| (7) 当外分替の事 | COULAS. GGT-GTT | G1y-V21 | Patterson | 380 | 26.1 | 8 |
| 1979年代代 (7) | COLLAI COOT-ACT. | | Marini | IIIC | 761 | 1193 |
| 0.7 C.X.Z.E | משני שנוי במפרידות | 27-610 | Costenti | JCE | •• | z |
| 01000 | | | Macdel ens | JCI. | ~ | 333 |
| 01025 | OTT CEA-CAA | 92 n19-614 | Groups | 200 | 200 | |
| DTC/256 | | • | GLOMO | ES. | 2 | = |
| 一 日本の マント シロボ | | | Grompe | PHAS | = | = |
| # B C | | AT-710 | 0116116 | Atture | 327 | 5 |
| 10 E | | • | Licht F. | 8 toches | 23 | = |
| 10年 10年 10年 10日 10日 10日 10日 10日 10日 10日 10日 10日 10日 | | G10-1/76 260 | Lynnet | AJRG. | = | |
| M/ | | _ | Oe Verne | Bolence | 23.7 | 2 |
| A W 2 4 3 7 11 | | Gly-Val 281 | Carey | Blood | | = |

Arg-term dro-trp dro-trp dro-trp Arg-Gla Arg-His Gly-Ser Gly-Neg Gly-Neg Val-Neg

語の第 C 次 Z 及 関 C か C 次 Z 及 職 品 的 C 次 Z 及 職 品 的 C 次 Z 及 ト か F か 2 か 以 ト か F か 2 か が 内 ト ケ 7 か 2 が 内

TP | 欠記記 TS || 次記記 フネンフィルブランド店 2 a フネンフィルブランド店 2 a

18

アミン経験化

8位子 均衡實化

交替的

R 1-We

 本発明は、上記の方法の実行に有用なキット又は試業系も目的としている。そのようなキットは本明體書に翻示されている方法に従う後定を行うのに必要な必須の成分から成る試業の組み合わせを含む。試業系は 商業的に包装された形態で、試験の相待性が許せば組成物又は混合物として、試験装置の形状で、あるいはより典型的に試験キットとして、すなわち試業を入れた1億又はそれより多い容器、装置などを組み合わせ、通常検定を行うために書かれた復示を含んで包装して与えられる。本発明のキットは本明細書に記載の標々の検定型式を行うためのいずれの形状及び組成物を含むこともできる。

すべての場合に試棄系は(1)本明報書に記載の固定可能な、又は盟 定されたハイブリッド形成パートナー、及び(2)ミスマッチー始合憂 白質又は機能的誘導体を含む。ミスマッチー結合蛋白質は場合により被 出可数な機能をされていることができる。キットは場合によりをスマッ チー結合蛋白質のための第1結合パートナー、例えば抗一MutSが体、 MutL蛋白質又は機能的誘導体、及び追加の結合パートナー又は検出 可能な機能をした試棄を含むことができる。本発明のキットはさらに補 助的化学品、例えばハイブリッド形成溶液の成分、試験試料中の2本植 検験を1本域形態に質損することができる変性剤、又は試料複数のフラ グメントを形成するための創販酵素を含むことができる。

ここで本発明を一般的に記載してきたが、以下の実施例を参照することにより本発明をさらに容易に理解することができるであろう。実施例は例として示すものであり、本発明を制限するものではない。

实施例[

突然変異DNA配列に関する血液からの試料の検定

映定型式は配名に一般的に記載されている。試料DNAは、1個の框 差対により、又は1個あるいは数量の複差対の付加又は欠失により野生 型と異なる特定の突然変異の存在に関して調べる血液循胞から得る。そ の後DNAを変性し、その時点で検定の準備ができる。

約30メクレオチドの試験DNAハイブリッド形成パートナーを、陶 郷の実施変異の付近の野生型遺伝子配列に対応する配列を有するように 構築する。ミスマッチに関する正の御車として、個状界血球へモグロビ ンの点実施変異を用いる。突然変異配列を有するオリゴヌクレオチド (エ クソン10) を加速する。独定のための負の標準として、野生型配列の ものであることが展知のオリゴヌクレオチド、エクソン10の野生型ヒ トヘモグロビン配列を製造する。

ハイブリッド形成パートナーDNAをニトロセルロースフィルター上 に以下の要領で都定する:

- (a) "ブラス"の印の佳道線の形態の試験ハイブリッド形成パートナーDNA。
- (b) 正の領珠のDNAを向一の"ブラス"の印の水平線の影館でフィルター上に固定する。
- (c) 負の領域のDNAを"プラス"の印の近辺の点の形態でフィルターに適用する。

フィルターを処理してポリゴヌクレオチドを固定し、従来の方法を用いてすべての非反応部位を端厳し、検定中のDNA及び譲白質の非特異的結合を防ぐ(Sambrook <u>et al</u>. 周上)。

し、正の領準のオリゴフクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然 変異配列を有するので反応が起こり、水平鏡が見える。この試料からの DNAは標的DNA配列中に点突然変異を有するので、"プラスの印" の悪度鏡が著色反応生成物を与える。

- 実施例) 1

MutL結合パートナーを用いた突然変異DNA配列に関する検定

一般的検定型式は、実施例1の記載と同様である。試料DNAは1個の協議対により、又は1個あるいは数額の協議対の付加又は欠失により 野生型と異なる特定の突然変異の存在に関して調べる血液細胞から得る。 その後DNAを変性し、その時点で検定の準備ができる。

約30 ヌクレオチドの試験DNAハイブリッド形成パートナーを、問題の突然変異の付近の野生型遺伝子配列に対応する配列を育するように 網路する。ミスマッチに関する正の棚準として、銀状酢血球ヘモグロビ ンの点突然変異を用いる。突然変異配列を育するオリゴヌクレオチド (エ クソン10) を製造する。検定のための負の標準として、野生型配列の ものであることが展知のオリゴヌクレオチド、エクソン10の野生型ヒ トヘモグロビン配列を製造する。

ハイブリッド形成パートナーDNAをニトロセルロースフィルター上に以下の整備で耐定する:

- (a) "プラス" の印の豊富峰の形態の試験ハイブリッド形成パートナーDNA。
- (b)正の標準のDNAを同一の"プラス"の印の水平線の彩館でフィルター上に固定する。
- (c)負の機単のDNAを"プラス"の印の近辺の点の形態でフィルタ

特表平7-500493 (14)

オリゴヌクレオチドフラグメントへの返した剣模フラグメントの結合を 起こす。

フィルターを批弁し、MutSをフィルターに加えて結合させ、再度 フィルターを批弁する。

ポリクローナル ウサギ抗ーMutS抗体をフィルターに加えて融合させ、非結合抗体を洗い流す。

その後ホースラディッシュパーオキシダーゼー共役ヒツジ抗ーウサギ 免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非能合抗体を洗い液す。

ホースラディッシュパーオキンダーゼに関する色素製基質を加え、着 色様 (又はプラスの印) が表れるまで発色反応を展開させ、棒が摂れた 時点で反応を止める。

精果は以下のように遅れるであろう:

- A. DNA中に点実然変異がない試料の場合(除性):
- (1)点(負の機能のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が 減った陽性ではないことを示す。
- (2) 水平線のみが見える。息者はおそらく正常なHb遠伝子を有し、 正の領準のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然変異 配列を有するので反応が起こる。
- (3) かくして着色 "マイナス" の印がフィルター上に現れ、試料中の 突然変異DNAに開する試験において簡性の結果を示す。
- B. DNA中に点突然変異を育する試料の場合(陽性):
- (1)点(負の無準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が 頂った陽性ではないことを示す。
- (2) "プラスの印" が見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を育

一に適用する。

フィルターを処理してオリゴヌクレオチドを配定し、健康の方法を用いてすべての非反応部位を遮蔽し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ(Sambrook et al. . 何上)。

試料DNAを10~100μg/m]の譲渡で加え、0.1-0.3 M NeC1中の45-55℃でハイブリッド形成反応を行い、3個の オリゴヌクレオチドフラグメントへの適した制限フラグメントの結合を 起こす。

フィルターを洗浄し、MutSをフィルターに加えて結合させ、再度 フィルターを洗浄する。

Mutl-8-ガラクトンダーゼ融合蛋白質を第1結合パートナーと して加え、結合させ、非雑合材料を洗い洗す。

第2結合パートナー、ポリクローナルウサギ抗〜8-ガラクトンダー ゼ抗血液をフィルターに加え、結合させ、非結合抗体を洗い流す。

その後第3結合パートナー、ホースラディッシュパーオキンダーゼ共 役とツジ抗ーウサギ免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体 を洗い流す。

ホースラディッシュパーオキシダーゼに関する色素原基質を加え、着 色線(又はプラスの印)が遅れるまで発色反応を展開させ、維が遅れた 時点で反応を止める。

雑果は以下のように異れるであろう:

- A. DNA中に点実然変異がない試料の場合(輸性):
- (1)点(食の領域のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が 誤った陽性ではないことを示す。

- (2) 水平線のみが見える。患者はおそらく正常なHb遺伝子を有し、 正の機構のオリゴヌクレオチドハイブリッド形成パートナーが実施変異 配列を有するので医応が起こる。
- (3) かくして着色 "マイナス" の印がフィルター上に積れ、試料中の 実然変異DNAに関する試験において除性の結果を示す。
- B. DNA中に点突然変異を育する試料の場合(陽性):
- (1)点(負の領準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が 誤った陽性ではないことを示す。
- (2) "プラスの印"が見える。この試料からのDNAは額的DNA配列中に点突然変異を育するので、"プラスの印"の最直線が着色反応生成物を与える。

実施例 1 1 1

植機試料中の突然変異 p 5 3 発傷遺伝子の検出

p53遺伝子は観察知圧遺伝子であると思われ(Levine、A.et al.、Nature 351:453-455(1991))、その中の多くの部位における突然変異が健康、特に大器肛門部(calorectal carcinoma)の発現を生ずる。例えばKinaler、K、W.et al.、Science 251:1366-1370(1991):Kern、S、E.et al.、Oncogene 6:131-136(1991);Vogelatein、B.、Nature 348:681-682(1990):Baker、S、J.et al.、Science 249:912-915(1990) も参照付よ。

戦瘍組織からヒトDNAを単離する。単幅されたDNAを環境的条件

免疫グロブリン抗体を加え、結合させ、非結合抗体を洗い液す。

ホースラディッシュパーオキンダ〜ゼに関する色素原基質を加え、着 色 "マイナス"又は"ブラス"の印が現れるまで発色反応を展開させ、 印が現れた時点で反応を止める。

結果は以下のように現れるであろう:

- A. 突然変異 p 5 3 発癌遺伝子がない試料の場合:
- (1)点(負の標準のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が 終った種性ではないことを示す。
- (2) 水平線のみが見える。患者はおそらく正の領郷のDNAに相傾的 な非突然変異配列を育し、正の標準のオリゴヌクレオチドハイブリッド 形成パートナーが突然変異配列を育するので反応が起こる。
- (3) かくして著色 "マイナス"の印がフィルター上に現れ、試料DNAの突然変異 p53 発癌遺伝子に関する試験において陰性の結果を示す。 B. 突然変異 p53 発癌遺伝子を育する試料の場合:
- (1)点(食の種類のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が 関った隔性ではないことを示す。
- (2) "プラスの印"が見える。患者はおそらく正常なけり遺伝子を育し、正の標準のオリゴフクレオチドハイブリッド形成パートナーが突然 変異配列を育するので反応が起こり、水平線が見える。この試料からの DNAは標的DNA配列中に少なくとも1個の点突然変異を育するので、"プラスの印"の悪麗殿が着色反応生成物を与える。

実施例IV

突然変異 p 5 3 発感遺伝子の発度の検出

ヒトmRNAを従来の方法により臓病組織から単離する(Sambr

特表平7-500493 (15)

下で資助する。その後DNAを変色し、その時点で検定の準備ができる。 概率的方法でD53進伝子に対応するCDNA分子を観慮し(Sam brook <u>et al</u>. 同上)、ハイブリッド形成パートナーとす る。最知の突然変異が内在する領域はD53配列金体に分散されている。 ハイブリッド形成パートナーDNAを以下のようにしてニトロセルロ ースフィルター上に関定する(図3を参照):

- (a) "ブラス"の印の岳度線の形態の試験ハイブリッド形成パートナー(p 5 3 c D N A) セスポットする。
- (b) 正の無準のDNAを隅一の"プラス"の印の水平線の形庫でフィルター上に翻定する。
- (c)負の領域のDNAを"プラス"の印の近辺の点の影響でフィルターに適用する。

フィルターを処理してハイブリッド形成パートナー ポリー又はオリゴヌクレオテドを翻定し、従来の方法を用いてすべての非反応配位を連載し、検定中のDNA及び蛋白質の非特異的結合を防ぐ。

試料 DNA を反応物に加え、ハイブリッド形成態度が55~60℃であること以外は(上記の通りの)ハイブリッド形成条件下でインキュベートし、3個のハイブリッド形成パートナー ポリー又はオリゴヌクレオチドフラグメントの適したDNAフラグメントの結合を起こす。

フィルターを洗浄し、MutSをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

ポリクローナルウサギ坑ーMutS抗体をフィルターに加えて結合させ、奔站合抗体を洗い施す。

その後ホースラディッシュパーオキシダーゼー共役ヒツジ抗ーウサギ

00k <u>et al</u>. 向上を参照)。 領域的方法で p 5 3 遺伝子に対応する c D N A 分子を製造し(S a m b r o o k <u>et al</u>. 両上) 、ハイブリッド形成パートナーとする。 検定型式は、図 3 に一般的に記載されている。

ハイブリッド形成パートナーDNAを以下のようにしてニトロセルロ ースフィルター上に固定する:

- (a) "プラス"の印の差直線の形態の試験ハイブリッド形成パートナー(p 5 3 DN A)をスポットする。
- (b) 正の標準のDNAは、腫瘍組織中で発見されることが知られており、改変された填蓄も1個有する遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドを含む。このDNAを同一の"プラス"の印の水平線の形態でフィルター上に閉定する。
- (c) 正の標準として用いたオリゴヌクレオチドの野生型配列を含む食の機体のDNAを"プラス"の印の近辺の点の形態でフィルターに適用する。

フィルターを処理していイブリッド形成パートナー ボリー又はオリ ゴタクレオチドを固定し、すべての非反応部位を進転し、検定中のDN A及び蛋白質の非特異的結合を妨ぐ。

試料mRNAを加え、反応物をハイブリッド形成条件下でインキュペートし、3個のハイブリッド形成パートナー ポリー又はオリゴヌクレオチドへのmRNAの物合を起こす。

フィルターを洗浄し、MuliSをフィルターに加えて結合させ、再度フィルターを洗浄する。

ポリクローナル ウサギ钪-MulS抗体をフィルターに加えて給合

させ、非独合抗体を洗い抜す。

その後ホースラディッシュパーオキシダーゼー共役とツジ状ーウサギ 免疫グロブリン状体を加え、結合させ、非結合状体を洗い放す。

ホースラディッシュパーオキンダーゼに関する色常原基質を加え、乗 也"マイナス"又は"ブラス"の印が表れるまで発色反応を展話させ、 印が表れた時点で反応を止める。

雑果は以下のように変れるであろう:

A、野生型p53造伝子を発痕する試料の場合:

- (1)点(食の領障のハイブリッド形成パートナー)は見えず、禁定が 譲った陽性ではないことを示す。
- (2) 水平線のみが見える。従って着色 "マイナス" の印がフィルター上に現れ、試料mRNA中の実施変異p53発電道伝子の発揮に関する試験における酸性の結果を示す。

B、突然変異 p 5 3 遺伝子を発表する試料の場合:

- (1)点(負の健康のハイブリッド形成パートナー)は見えず、検定が 禁った無性ではないことを示す。
- (2) "ブラスの印"が見える。患者はおそらく正の領境のDNAに相 補的な非突然変異配列を有し、正の標準のオリゴフクレオチドハイブリッ ド形成パートナーが突然変異配列を有するので反応が起こり、水平線が 見える。この試料からのmRNAは額的配列中に少なくとも1個の点突 熱変異を有するので、"ブラスの印"の患変線が着色反応生成物を与える。

実施例V

mu t S張白質によるミスマッチ検出

む暖断液 B (20mMのKPO。 pH7. 4、0.1mMのEDTA、1mMのPMSF、10mMの2ーメルカプトエタノール) 中で1:10に増収し、直接に1.5x30cmのHepar.inーSeparoae CL6B(Pharmacia)カラムに2m!/分にて適用した。カラムを0.1MのKClを含む100m!の緩衝放 Bで洗浄し、暖断液 B中のKClの直線勾配(0.1-0.5M)を300m]用いて溶液した。100億の3m!智分を集めた。試料を選元条件下で4-20%のSDS-PAGEゲル上で移動させ、>95%のmutS蛋白質(97kDa)を含む智分をブールした。ブールした物質に20%の最終線度までグリセロールを加え、アリコートを-70でで保存した。

オリゴスクレオチド、Biopolymer Lebsからオリゴヌクレオチドを得た。オリゴヌクレオチドの配列は、ヒトターグロブリン連伝子中の微状界血球突然変異の部位の回りの30性基からとった。オリゴヌクレオチドをニトロセルロースフィルターに固定するために、Bソ 25merポリーC "風部"及び5 アミノ体体基を育する遊ばれたオリゴヌクレオチドを興製した。これらの実験で用いた配列を安全に示す。(記:実際の微状界血球突然変異はA:T→T:Aトランスパージョンである。)オリゴヌクレオチドを罹々の組み合わせ中でアニーリングし、G:T、A:C及びG:Gミスマッチ、(野生型配列を育するオリゴヌクレオチドを1個の塩基の付加又は欠失突然変異を育するオリゴヌクレオチドにアニーリングした場合に形成されるような)1個の不対位番を育するヘテロ2本機、及び2個の異なるホモ2本側、すなわち完全に物能的な2本機を形成した。アニーリング条件は下記に記載する。

抗一mu t S抗体、ポリクローナル抗ーmu t S抗体は、ニュージー

材料及び方法

無防。mutS発電プラスミドpMS312 (Su and Modrich, Proc. Nail, Acad, Sci. USA, <u>83</u>:5057, 1986) の申入により1, 21 (ラムダ cl857 Nt AH kil') をmutS過剰生産事件とした。

mutSの特製、mutS特製業は、Su及びModrich(関上) により記載された方法の修正法である。1. 2L(pMS312)細胞 を50μg/mlのアンピシリンを象む8リットルの869結婚(10 g/iのBacto-Trypton (Difco)、5g/jの酵母 抽出物(Difco)、5g/lのNaCl) 中の30℃にてOD*** # 1. 3-1. 8まで成宵した。 結髪物を60℃に子僧加速した869 培地中で1:2に希釈し、42℃で5時間インキュペートした。培養物 を冷却し、遠心により報数を収穫し、細胞ペーストを一70℃で保存し た。無数ペースト(15-29ゲラム)を氷上で解凍し、細胞を等体費 の破断液A(20mMのKPO。、pH7、4、1mMのEDTA、1 mMのPMSF、10mMの2ーメルカプトエタノール)に再動房した。 細胞を氷ーアセトン沿中の音波処理によりライシスした。 ライセートを 遠心により透明とした(40.000g:30分)。上茂み故を緩衝液 A中の25%(W/v)のストレプトマイシンサルフェート1/4体検 で処理し、4℃で45分間提体した。不信性物質を遅心により除去した (40.000g;30分)。硫酸アンモニウム (上度み放1ml当た り0.2g)も15分間かけて加え、製剤放を4℃にてきらに40分間 撹拌した。 遠心により沈景を集め(40、000g:30分)、10m 1の級的液Aに再動機した。1m1の智分を0、0.25MのKCIを含

ランド白ウサギ(Pel Freez)に特製mutS蛋白質を注射することにより得た血情から調製した。蛋白質Gーセファロース(Pharmacia)カラムクロマトグラフィーにより抗体を部分的に検製した。ドットプロット分析において、10μg/mlの抗ーmutS抗体は1ngの特製mutS蛋白質を検出することが見いだされた。

結果

<u>椿液中でアニーリングされたヘテロ2本臓中の</u>ミスマッチ<u>の検出</u>

図4に示されているデータは、G:T及びG:G含有ヘテロ2本額が mutS蛋白質により検出されることを示す。検出はmutSに依存し ており、ヘテロ2本額DNAと額争することができるがホモ2本額DN Aと額争しない。A:Cミスマッチ及び1個の不対塩基を育するヘテロ 2本額の場合にも同様の結果が得られた(データは示さない)。

脚定オリゴヌクレオチドへのアニーリング

"テイリングされた(tailed)"オリゴヌクレオテドをフィルター上にスポットし、30merのオリゴヌクレオテドをそれにアニーリングした。 結果 (図5) は溶放中でアニーリングすることにより調製したヘテロ2本級の場合に得た結果 (図4)と同一である。ホモ2本級(図定オリゴヌクレオテドの30mer都分と正確に铝铀的な30merオリゴヌクレオテドを用いて形成した)は検出されなかった。

競争オリゴスクレオチドの存在下のアニーリング

報酬的30mersをアニーリングすることによりホモ2本額を開設 した。その後 "テイリングされた" オリゴミクレオテドを加え、ホモ2 本額を変性し、混合物を再アニーリングした。以料をフィルター上にスポットした。図6はそのような条件下でG:Tミスマッチが依出される ことを示し、"テイリングされた"オリゴヌクレオチドが複雑的オリゴ スクレオチドに関して30mersと有効に競争することを示している。 そのような条件は、突然変異被出装定で用いられ得る条件と一致してい る。そのような検定では、試料DNAは制限酵素により切断されるか(ゲ ノムDNAの場合)、又はPCRにより課製される。いずれの場合もD NAは2本領であり、従ってプロープとして用いられるティリングされ たオリゴヌクレオチドと関一でそれと競争することができる配列を会ん でいる。

車4に示されている特別は以下の要領で行われた実験から得た!

等量のオリゴヌクレオチドをアニーリングすることによりヘテロ2本 輸及びホモ2本額を開製した。"テイリングされた"オリゴヌクレオチ ドは55複基長なのでほとんど2倍過剰の30mecgがあり、すべて の"テイリングされた"オリゴヌクレオチドが2本機となる傾向が増加 TO. THE (10mMOFUZ, pHS, 0, 0, 1MONACI, 1mMのEDTA)中の $5 \mu g$ ($50 \mu I$ 中) のそれぞれのオリゴヌク レオチドを混合し、70℃に10分間加熱し、30分間室巣に冷如し、 水上で冷却した。アニーリングされた分子(2 μ l 中 l μ l) を 2 5 m mのニトロセルロース円板(孔径O、45ミクロン、Scleiche r and Schuell)上にスポットした。第1(抗-mutS) 及び第2抗体ならびにアルカリ性ホスファターゼ発色系のための正の標 準として10ngの特製kutSをフィルター上にスポットした。フィ ルターを空気乾燥し、2mlの反応緩衝液(20mMのトリス、pH7. 4. O. OlmMoEDTA. O. 5mMoMgCls. O. OlmM のDTT)及び3%(W/V)無鉛的乾燥乳を含む6ウェルの組織培養

1με (2μ) の "テイリングされた" オリゴヌクレオチドをニトロ セルロースフィルター上にスポットした。フィルターを空気乾燥し、2 mlのTNEを含む6ウェル板に移した。2μg (4μl) の30me ェオリゴヌクレオチドを加えた。仮を70℃の水指中に10分間浮かせ、 富温で30分間インキュペートし、氷上に置いた。その後フィルターを、 図4に示す結果と耐速して上記に記載した通りに処理した。

園6に示されている効果は、以下の要領で行われた実験から得た: 等量の30merオリゴヌクレオチドを図4に対する説明中に記載の 通りにアニーリングした。等飲の"テイリングされた"オリゴフクレオ チドを加え、混合物を85℃に10分間加熱し、その後宝温で30分間 インキュペートした。その後の役階はすべて図4に対する説明中に記載 の乗りである。

アニーリングを容易にするために、1本錐DNA結合蛋白質の代わり にTecA蛋白質を用いることができることを指摘しなければならない。

オリゴヌクレオチド配列

⊕ 2

1) *ccc...ccGCACCTGACTCCTGGGGAGAAGTCTGCCGT 突然变具体! 2) *ccc...ccGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGT 野生型 CGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCA 野牛型 CETGGACTGAGGACGCCTCTTCAGACGCCA 突然変異体

CGTGGACTGAGGACCCCTCTTCAGACGGCA 5) 6) CGTGGACTGAGGACCCCCTCTTCAGACGGCA

3)

4)

突然密集体 (+1 填基)

夾然安具体

ートした。フィルターを格皮の観影故(4x2ml)で洗浄し、1本領 純合蛋白質(Promesa) 溶液(反応板製液中100g ェノmlに て1m1)と共にインキュペートした(4℃で30分割)。 フィルター を冷皮心能倒破(4×2ml)で洗浄し、(i)1mlの皮心破損液、 (ii) lmlの皮皮板術被及び10μg/mlのmutS、又は (til) 1 mlの反応帳折放及び10gg/mlのmuiS及び1g ま/m I の上記の通りにアニーリングしたホモ2本額又はヘテロ2本額 30magaと共にインチュベートした(4℃で30分間)。 フィルタ ーを冷反応緩耐液(4×2ml)で洗浄し、抗ーmutS抗体(反応緩 衝検及び3%の無路防乾燥乳中50μg/mlにて2mi) と共にイン キュペートした(4℃で2時間)。 フィルターを冷反応級罰液(4x2 ml)で洗浄し、アルカリ性ホスファターゼに共役させたヒツジ抗ーウ サギIaC(Bio~Rad)の1:1000希釈(反応模衡被及び3 %の無鉛肪乾燥乳中)2mlと共にインキュペートした(4℃で1時間)。 フィルターを冷反応帳前後(4x2ml)で洗浄し、2mlの新しい裏 衆級衡枚(100mMのトリス、pH9.5、100mMのNaCl、 5mMのMgCls、0.165mg/mlのプロモクロロインドイル ホスフェート(ジメチルホルムアミド中の保存溶液から1:100に希 釈)、0.33mg/m1のニトローブルーテトラゾリウム(ジメチル ホルムアミド中の保存信頼から1:100に希釈))と共にインキュベ ートした(宝亀で10-20分間)。フィルターを水で数回洗浄し、反 応を止めた。

ૼૼૼૼ (Paicon)に移し、種中かに振りながら4℃で昨夜インキュベ

特表平7-500493 (17)

園5に示されている結果は、以下の要領で行われた実験から得た:

キー5'アミノ佐飾基

I - ポリC尾部及び5′アミノ等的基なしでも調製

豊2への凡供

| オリゴヌクレオチドアニーリング | | 配列番号 |
|---------------------|----|-----------|
| 1+3=G:Tミスマッチ | 1) | SEQ ID #1 |
| 1 + 4 = G : G ミスマッチ | 2) | SEQ ID #2 |
| 1+5=ホモ2本鏡 | 3) | SEQ 10 #3 |
| 1+6=付加/欠失ヘチロ2本値 | 4) | SEQ ID #4 |
| 2+3=ホモ2本鏡 | 5) | SEQ ID 45 |
| 2+5=A:Cミスマッチ | 6) | SEQ ID #6 |

同等例

ここで本発明を完全に記載したが、本発明の精神及び範囲から遠説す ることなく、及び不必要な実験を行うことなく関等のパラメーター、連 度及び条件の広い範囲内で同一のことが行えることは、当該技能分野に おける熟練者にわかるであろう。

本発明をその特定の無様に関連して記載してきたが、さらに修正が可 能であることは理解されるであろう。本出版は、一般に本発明の原理に 從い、本発明に関連する技術内で展知の又は遵常行われる実行に含まれ、 総付請求の範囲内に示す達り前記に示されている必須の特徴に適用する ことができる本間分からのずれを含むいずれの変更、利用又は適用も含 むものとする。

特表平7-500493 (18)

| 宏列等号: 1 | | |
|-----------|--|--|
| 密別の長き:35 | | |
| 配列の型:故歌 | | |
| 値の数:1本級 | | |
| トポロジー:直線状 | | |
| 配列の種類:DNA | | |
| 尼州 | | |

CCCCCGCACC TGACTCCTGC GGAGAAGTCT

GCCGT

記判書号:2 配列の長き:35 配列の型:核酸 彼の数:1本額 トポロジー:腹領状 配列の種類:DNA

CCCCGCACC TGACTCCTGA GGAGAAGTCT

配列参号:3 聖判の長き:30 .

配列

CGTGGACTGA GGACCCCTCT TCAGACGGCA

配列番号:6 配列の長き:31 配列の数:複融 鏡の数: 1 本籍 トポロジー:蓮鶴状 配列の種類:DNA

CGTGGACTGA GGACCCCCTC TTCAGACGGC

配列の型:技験 40数:1本値 トポロジー:塩糖状 配列の機構: DNA EM

CGTGGACTGA GGACTCCTCT TCAGACGGCA

配列参号:4 配残の長き:30 配列の型: 核酸 トポロジー:直線状 配列の程度:DNA 配列

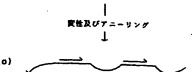
CGTGGACTGA GGACGCCTCT TCAGACGGCA

配列音号:5 配列の長き:30 配列の型:技験 鎖の数: 1 本領 トポロジー:麻焼状 配列の種類:DNA

突然変異の存在に関して調べるペキDNAハイブリットの略図

(ロ)オリゴヌクレオチド (b) c-DNA

試験DNA(ゲノムフラグメント)



ミスマッチ会有DNAハイブリットの略因

(0) オリゴスクレオチド (b) c-DNA

FIG. I

特表平7-500493 (19)

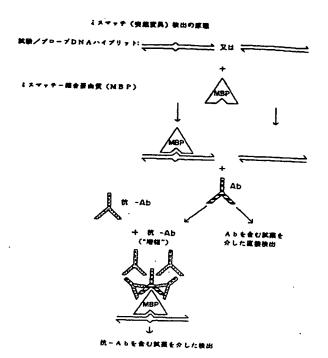
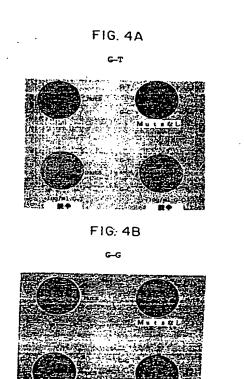


FIG. 2



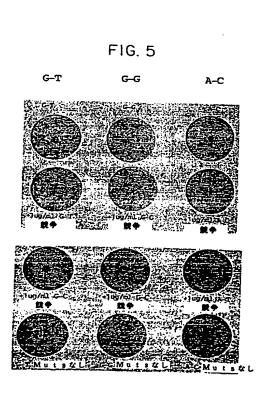
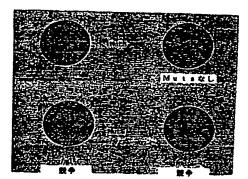


FIG. 6



| COLUMN | CATON OF SILE | LET HALTED A THE STREET | | |
|-------------|--|---|--|--|
| - | 9 C1801/6 | | Charleson and art | |
| | | | | |
| # 144 TE | N-45 CHAP | | | |
| - | | | One terms | |
| | | | | |
| lat.Cl. | • | C150 | | |
| | | Transmission Commission only | e des Affections Descriptions on Description to the Philip Description | |
| | | | | |
| | | o to be house! | | |
| Carrierio . | (States of St | معلقها برجمة بمهامية بمرحة للكملة | make, of the restricts property. | Barrier in China Aud |
| • | Il Marci | 179 735 (LIFECODES COR 1 1967 1 3, 11nc 8 - 11nc 62; | = | 1-6 |
| ' | MUCLEIC Vol. 16, US | ACIDS RESEARCH. | | 1-6 |
| į | J.JIRTCH eligonus celi mus cited in | 43 - 7833 IY ET AL. 'Mismetch-ce: lectide duplemes bound 3-ancoded protein' the application whole deciment, espec | d by the E. | |
| | | | -/ | |
| 4444 | | and ages of the set which is one to reduce the day techniques for an order day techniques for the common education of the publication state of apprint the set of the common set of apprint the set of the common set of apprint the set of the common set of apprint the set of the common set of apprint set of set of the common set of the c | And to send the factor of the day | ingli bromites distilland in the depression and depression depression deliber in parameters deliber |
| v. (2.212) | | · Innered Series | | |
| | 13 NOVEMB | | 21, 12, 12 | 92 |
| الكنب | EUROPEA | N PATENT OFFICE | LUZZATTO E.R. | |
| | | | | |

| III. 8013.540 | NTS CONSIDERED TO BY, SELECAPT CONTINUED DESCRIPTION THE SECOND PROPERTY. | 701703 92708043 |
|---------------|--|------------------|
| - | Comme of Description, was noticed a clear tegraphies, of the mirror prompts | |
| | | Ramon in Cale to |
| ` | EP,A,O 210 251 (MOLECULAR DEVICES SORPORATION) 5 April 1006 Application see page 2, line 60 - line 52; claims | 1,6-12 |
| 1 | | 1 |
| - 1 | | 1 |
| - [| | 1 |
| ı | | I |
| - 1 | |] |
| - 1 | | 1 |
| - 1 | | 1 |
| - 1 | | 1 |
| - 1 | • | 1 |
| - 1 | | i |
| - 1 | | } |
| | | } |
| ı | • | 1 |
| | | 1 |
| - 1 | | I |
| - 1 | | |
| - 1 | | 1 |
| - 1 | | 1 |
| - 1 | | 1 |
| | | 1 |
| - 1 | | 1 |
| - 1 | | 1 |
| - 1 | | ſ |
| | | 1 |
| - 1 | | 1 |
| | | 1 |
| - } | | 1 |
| | | 1 . |
| | • | 1 |
| - 1 | | |
| - 1 | | 1 |
| - 1 | | į. |
| | | 1 |

| = | M | ŧ | ** | • | į | 9206045 6296 |
|------|------|---|----|---|---|-----------------|
| | | | | | | |

| Priori discriptions where in started respect | Profession | Printed Security Commissional | Publication |
|---|------------|---|---|
| G8-A-2179715 | 11-03-67 | US-A- 479407 BE-A- 90534 UE-A- 362919 FR-A,8 258670 JP-A- 6215849 | \$ 27-12-88 8 02-03-87 0 05-03-87 5 06-03-87 |
| EP-A-0310251 | 05-04-89 | US-A- 497850 UP-A- 201700 US-A- 496365 US-A- 501177 | 0 19-01-90 8 16-10-80 |
| | | | |
| | | | |
| | • | | |
| | | | • |
| | | | |
| | | | |
| • | ٠. | | |
| | | | |